Canada

Energy, Mines and Resources Canada
Énergie, Mines et Ressources Canada

PRODUCTION D'ÉTHANOL ET DE POLYOLS PAR FERMENTATION AVEC UNE LEVURE OSMOPHHILE

DIVISION DES ÉNERGIES RENOUVELABLES

PRÉPARÉ POUR:

Programme de Développement de la Bio-énergie
Divison des Énergies Renouvelables
Energie, Mines et Ressources Canada
Ottawa, Canada
Contrat MAS # 23216-6-6096
(20 mars 1987)

PRÉPARÉ PAR:

Denis Groleau, Ph.D
Centre de recherche industrielle du Québec (CRIQ)
333, rue Franquet, C.P. 9038
Sainte-Foy, (Québec)
G1V 4C7
(418) 659-1550, poste 405

AUTORITÉ SCIENTIFIQUE:

Dr. W.E. Lowe
Énergie, Mines et Ressources Canada

CITATION

Groleau, Denis. Production d'éthanol et de polyols par fermentation avec une levure osmophile. Rapport du contract MAS #23216-6-6096. Direction des énergies renouvelables; Energie, Mines et Ressources Canada, Ottawa, Ontario, 1987, 116 pp.

On pourra obtenir des exemplaires de ce rapport en s'addressant à:

Direction des Energies Renouvelables
Energie, Mines et Ressources Canada
580, rue Booth
Ottawa, Ontario
K1A 0E4
(613) 995-9447

ou

CISTI
Conseil national de la
recherche, Edifice M-55
Route de Montréal
Ottawa, Ontario K1A 0S2
(613) 993-1585

Il est entendu que ce rapport est distribué librement uniquement pour fins d'information et ne réflète pas nécessairement l'opinion du Gouvernement du Canada. De plus, ce rapport ne veut en rien endosser tout produit commercial ou toute personne mentionnée dans ce rapport. Ni le Canada, ni ses ministères, gestionnaires, employés ou agents ne peuvent offrir quelconque garantie quant à ce rapport ou encore être tenus responsables du contenu de ce rapport.

© Ministre des Approvisionnements et Services Canada 1987

N° de catalogue M91-7/1-1987F
ISBN 0-662-94390-2

REMERCIEMENTS

Le responsable principal des travaux désire remercier bien sincèrement les personnes suivantes pour leur excellent appui professionnel et technique:

. J. Delaunais, G. Genest, J. Gingras: gestion administrative du projet et dactylographie;

. A. Courcelles, C. Giroux et L. Thibault: contribution importante au support technique (analyses, microbiologie, biochimie);

. Dr. G. Handfield: aide précieuse dans la négociation de ce contrat et la rédaction du rapport final;

. Dr. R. Tsé: chef du groupe Biotechnologie et alimentation (CRIQ) et en partie à l'origine de l'idée première de ce projet.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

PRÉFACE

Ce rapport présente les résultats de la première partie d'un projet intitulé "Production d'éthanol et de polyols par fermentation avec une levure osmophile "(contrat M.A.S. no 23216-6-6096/01-SZ) dont les travaux furent généreusement financés par Energie, Mines et Ressources Canada.

Ce projet doit être vu comme une étude de faisabilité, à petite échelle généralement, d'un procédé de production d'éthanol et de divers polyols (glycérol, D-arabitol, D-mannitol, i-érythritol, etc.) par fermentation avec des levures osmophiles. La contribution attendue de ce projet au domaine de la bio-énergie serait comme suit: l'éthanol pourrait servir de carburant liquide alors que les polyols pourraient être utilisés dans l'industrie des plastiques, remplaçant ainsi indirectement le pétrole. Les travaux décrits dans ce rapport furent effectués entre juin 1986 et mars 1987.

Nous pensons que ce rapport devrait intéresser, outre les personnes impliquées en bio-énergie, certains intervenants dans les domaines industriels suivants:

. alimentation (aliments diététiques, édulcorants, éthanol);
. pétrochimie (résines, polymères);
. amidonnerie (conversion de l'amidon en certains polyols - diversification de l'industrie).

ABRÉGÉ

L'objectif premier de cette partie de notre projet était de démontrer la faisabilité, à petite échelle, d'un procédé de fermentation employant une levure osmophile pour la production efficace d'éthanol et de certains polyols d'intérêt industriel. L'éthanol pourrait servir comme carburant liquide alors que certains polyols (glycérol, D-mannitol, D-arabitol, i-érythritol) sont présentement utilisés (ou pourraient l'être) dans l'industrie chimique, alimentaire ou pharmaceutique.

Afin d'atteindre cet objectif, les travaux suivants furent effectués:

(1) criblage de 36 levures osmophiles et sélection de la levure la plus performante;

(2) optimisation partielle du milieu de culture: influence de l'extrait de levure et de certains sels minéraux;

(3) mesure de l'influence de l'agitation et de l'aération;

(4) fermentation à l'échelle 16 litres.

Suite à ces travaux, il nous est possible de faire état des observations suivantes:

(1) la levure osmophile Saccharomyces bisporus var. mellis ATCC 12572 sembla le microorganisme le plus approprié pour nos besoins. Cette levure produit des quantités appréciables d'éthanol, de glycérol, et d'un mélange apparent de

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

D-arabitol et de D-mannitol (ces deux substances ne peuvent être séparées pour l'instant). Notre levure ne produit pas cependant le i-érythritol;

(2) une concentration relativement élevée (1%, P/V) en extrait de levure était requise afin d'obtenir une conversion efficace du glucose en éthanol et en polyols. La même observation fut faite avec trois autres levures osmophiles;

(3) des tests effectués avec quatre sels (NaCl, KCl, $MgSO_4$, et KH_2PO_4) indiquèrent que l'ajout de ces sels fut généralement néfaste ou sans effet bénéfique apparent sur la fermentation. Ces résultats suggèrent que S. bisporus var. mellis ATCC 12572 est probablement une levure osmophile plus tolérante envers les sucres qu'envers les sels;

(4) un bon niveau d'aération et d'agitation était nécessaire afin d'obtenir des fermentations efficaces: l'agitation seule était insuffisante. L'aération était cependant nuisible à l'accumulation de l'éthanol;

(5) les résultats obtenus de travaux à petite échelle se sont avérés généralement transposables à l'échelle 16 litres.

Notre fermentation possède certains atouts qui la rendent certes attrayante du point de vue industriel:

. fermentation relativement rapide (100 h et moins);
. concentration intéressante des principaux produits:
  - éthanol (30-37 g/L)
  - glycérol (38-40 g/L)
  - D-arabitol + D-mannitol (50-52 g/L);
. possibilité d'utiliser les cellules pour l'alimentation animale;
. fermentation versatile.

CRIQ

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE DE TYPE EXECUTIF ix

RESUME xiii

LISTE DES FIGURES xiv

LISTE DES TABLEAUX xvi

INTRODUCTION 1

OBJECTIFS 7

METHODES 9
Milieu de culture 10
Préparation des inoculums 10-11
Analyse des sucres et des produits de la fermentation 12
- analyse qualitative 12
- analyse quantitative 13
- révélation des plaques avec le nitrate d'argent 14
- préparation des échantillons 15

RESULTATS 17
- Mini-Revue: les levures osmophiles et leur potentiel pour la production d'éthanol et de polyols 19
  . Levures osmophiles: définition 20
  . Ecologie des levures osmophiles 21
  . Mécanisme de résistance aux fortes pressions osmotiques 21
  . Production de polyols 22
  . Facteurs affectant la production de polyols 23
    . Influence de la composition du milieu de culture 25
    . Influence de la température 26
    . Influence de l'aération 27
    . Influence du pH 29
  . Potentiel industriel des levures osmophiles 30
- Optimisation: analyse quantitative de certains sucres, de l'éthanol et de divers polyols par chromatographie en phase liquide sous haute pression ("HPLC") 32
- Criblage: criblage ("screening") d'un certain nombre de levures osmophiles 36
  . Etape 1 37
  . Etape 2 39
  . Sélection des souches 43

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

TABLE DES MATIERES (SUITE)

- Influence de l'extrait de levure..... 44
  - Préparation des divers milieux de culture..... 45
  - Inoculation et conditions d'incubation..... 46
  - Influence sur la consommation du glucose..... 48
  - Influence sur la production d'éthanol..... 49
  - Influence sur la production de glycérol..... 54
  - Influence sur la production de l'i-érythritol..... 55
  - Influence sur la production du mélange D-arabitol + D-mannitol.... 56
  - Conclusion préliminaire..... 56
  - Sélection de la meilleure levure osmophile..... 57
- Influence de certains sels minéraux..... 60
  - Préparation des divers milieux de culture..... 61
  - Inoculation et conditions d'incubation..... 62
  - Influence du sulfate de magnésium..... 64
  - Influence de chlorure de sodium..... 66
  - Influence du chlorure de potassium..... 66
  - Influence du phosphate de potassium..... 66
  - Conclusion préliminaire..... 68
- Influence de l'agitation et de l'aération..... 71
  - Influence de l'agitation..... 72
  - Influence de l'agitation + aération..... 75
  - Conclusion préliminaire..... 78
- Fermentation à plus grande échelle (16 L)..... 81

DISCUSSION..... 91
- Criblage des levures osmophiles..... 91
- Production d'éthanol..... 93
  - Potentiel..... 93
- Production de glycérol..... 94
  - Potentiel..... 94
- Production de D-arabitol + D-mannitol..... 95
  - Potentiel..... 95
- Influence de l'extrait de levure..... 97
- Influence de certains sels minéraux..... 100
- Influence de l'agitation et de l'aération..... 102
- Fermentation à plus grande échelle..... 103

CONCLUSIONS..... 105

RECOMMANDATIONS..... 108

BIBLIOGRAPHIE..... 110

ANNEXE "A": Exemples d'analyses de sucres et de polyols par chromatographie sur couche mince de cellulose..... 114

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

SOMMAIRE DE TYPE EXECUTIF

La biomasse peut remplacer le pétrole de deux façons. D'une part, la biomasse peut être convertie en énergie combustible (éthanol, méthane) remplaçant ainsi les combustibles fossiles. D'autre part, la biomasse peut être transformée en substances chimiques qui autrement seraient probablement produites à partir du pétrole (exemples: acide acétique, glycérol, butanol, isopropanol, etc.). Nous sommes présentement en train de développer un procédé de fermentation qui a le potentiel de contribuer au domaine de la bio-énergie de ces deux façons.

L'objectif global de notre projet est de mettre au point une fermentation, utilisant une levure osmophile, permettant de convertir certains sucres en un mélange d'éthanol et de certains polyols d'intérêt industriel. L'éthanol pourrait servir comme carburant liquide alors que certains polyols (glycérol, D-mannitol, D-arabitol, i-érythritol) sont présentement utilisés (ou pourraient l'être) dans l'industrie chimique, alimentaire ou pharmaceutique.

Dans ce rapport, nous présentons les résultats de la première partie du projet; cette étape avait pour but de démontrer la faisabilité, à l'échelle du laboratoire, du procédé de fermentation que nous désirons développer et optimiser. Ces travaux furent généreusement financés en totalité par Energie, Mines et Ressources Canada (Division des Energies renouvelables). On trouvera, au Tableau I, une liste des applications existantes ou potentielles de l'éthanol et des polyols. De plus, afin de situer notre projet dans son contexte, on pourra aussi trouver à la page 5 une liste d'autres chercheurs ou compagnies présentement intéressés aux levures osmophiles et à la production de certains polyols par fermentation.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Les travaux de cette première partie du projet ont conduit à plusieurs réalisations et observations intéressantes:

(1) une mini-revue portant sur les levures osmophiles et leur potentiel pour la production d'éthanol et de polyols a été préparée et est incluse dans ce rapport (pages 19 à 31). Il pourrait être utile au lecteur de parcourir cette mini-revue afin de se familiariser avec le domaine;

(2) ce projet nous a permis d'améliorer notre méthode d'analyse quantitative employant la chromatographie liquide sous haute pression ("HPLC") (voir pages 32 à 35). Malheureusement, notre méthode ne peut séparer les polyols D-arabitol et D-mannitol; nous sommes ainsi forcés, pour l'instant, de rapporter les résultats comme un mélange apparent de D-arabitol et de D-mannitol;

(3) lors de nos travaux de criblage, plusieurs levures osmophiles nous sont apparues très intéressantes: certaines levures produisirent des quantités appréciables d'i-érythritol, un polyol hypocalorique qui pourrait servir d'édulcorant dans les aliments diététiques, et d'autres levures formèrent soit du mannitol soit du sorbitol. La levure osmophile Saccharomyces bisporus var. mellis ATCC 12572 sembla la plus intéressante selon nos critères: cette levure produit des quantités appréciables d'éthanol, de glycérol, et du mélange D-arabitol + D-mannitol, mais ne forme pas d'i-érythritol;

(4) les levures osmophiles requièrent une concentration relativement élevée (1%, P/V) en extrait de levure afin de convertir efficacement le glucose en éthanol et polyols;

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

(5) l'ajout de certains sels minéraux (NaCl, KCl, $MgSO_4$, KH_2PO_4) ne fut pas généralement bénéfique aux fermentations conduites avec S. bisporus var. mellis ATCC 12572. Par contre, le sulfate de magnésium sembla favoriser sensiblement la production de l'éthanol avec cette levure;

(6) des travaux faits en petits fermenteurs (2 L) indiquèrent qu'une bonne agitation seule ne suffisait pas pour obtenir une fermentation efficace; la fermentation exigeait un bon niveau d'aération (0,66 à 1,0 VVM) pour la conversion efficace du glucose en produits. L'aération, toutefois, fut nuisible à la production (ou l'accumulation) de l'éthanol;

(7) les résultats précédents obtenus de travaux à petite échelle (fioles, petits fermenteurs) furent généralement reproduits dans une fermentation à l'échelle 16 L; ceci augure bien pour l'avenir.

Les résultats de cette première partie du projet sont très satisfaisants et démontrent le bon potentiel industriel de notre fermentation. En effet, notre fermentation est relativement rapide (100 h et moins), facile à effectuer, et fournit des quantités intéressantes des principaux produits; éthanol, 30-37 g/L; glycérol, 38-40 g/L; D-arabitol + D-mannitol, 50-52 g/L. Nous pensons que cette fermentation devrait être développée surtout dans le but de produire les polyols, la production d'éthanol devant être considérée comme un bénéfice additionnel de cette fermentation.

Notre fermentation est un bel exemple de conversion de la biomasse en combustible liquide (éthanol) et en produits chimiques

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

(polyols) et, selon nous, mérite d'être développée et optimisée plus à fond. Nous suggérons les travaux suivants:

(1) une meilleure optimisation des conditions d'aération et l'utilisation de fermenteurs de type "airlift" permettant un meilleur transfert de l'oxygène;

(2) un examen de l'influence du pH sur le rendement des divers produits, particulièrement celle de conditions alcalines;

(3) déterminer si une fermentation en deux étapes, permettant de découpler la production de biomasse microbienne de celle des produits, serait plus avantageuse qu'une production en une seule étape;

(4) évaluer la pertinence de conduire cette fermentation dans un mode d'alimentation programmée ("fed-batch") en continu ou semi-continu;

(5) utilisation de substrats plus réalistes tels les hydrolysats d'amidons.

EXECUTIVE SUMMARY

Biomass can be used as an oil substitute in two ways. It can be converted to ethanol, methane and other energy sources that replace fossil fuels, or transformed into chemical substances that in all probability would otherwise be produced from oil (acetic acid, glycerol, butanol, isopropanol and so on). We are currently developing a fermentation process that has the potential to enhance the field of bioenergy in this way.

The overall objective of our project is to develop a fermentation process using an osmophilic yeast that will allow certain sugars to be converted to a mixture of ethanol and industrial polyols. The ethanol could be used as a liquid fuel; some of the polyols (glycerol, D-mannitol, D-arabitol and i-erythritol) are already being (or have the potential to be) used in the chemical, food and pharmaceutical industries.

This report contains the results of the first phase of the project, the purpose of which was to demonstrate the feasibility, within the scope of the laboratory, of the fermentation process we hope to develop and perfect. The project was entirely funded by the Renewable Energy Branch of Energy, Mines and Resources Canada. Table 1 lists current and potential uses of the ethanol and polyols, and, to put the project in its proper context, page 5 gives a list of other researchers or companies currently investigating osmophilic yeasts and the production of polyols through fermentation.

The first phase of the project produced a number of interesting observations and results:

1. A mini-magazine on osmophilic yeasts and their potential use in the production of ethanol and polyols has been prepared and is included in this report (pages 19 through 31); the magazine may help readers become more familiar with the field.

2. The project enabled us to improve our method of quantitative analysis using high-pressure liquid chromatography (see pages 32 through 35). Unfortunately, our method cannot separate D-arabitol and D-mannitol. Consequently, we must, for the time being, report the results as an apparent mixture of D-arabitol and D-mannitol.

3. During the screening phase, we found a number of very interesting osmophilic yeasts. Some of these produced significant quantities of i-erythritol, a low-calorie polyol that could be used as a sweetening agent in diet foods, while others formed either mannitol or sorbitol. Saccharomyces bisporus var mellis (ATCC 12572) appeared to be the most interesting yeast by our standards. It produced significant quantities of ethanol, glycerol and the D-arabitol/D-mannitol mixture, but did not produce i-erythritol.

4. The concentration of osmophilic yeast in yeast extracts must be relatively high (1% P/V) to efficiently convert glucose to ethanol and polyols.

5. Generally, the addition of mineral salts (NaCl, KCl, $MgSO_4$, KH_2PO_4) did not help the fermentation processes that used S bisporus var mellis (ATCC 12572). However, the magnesium sulfate appeared to promote considerable ethanol production from this yeast.

6. Tests performed in small (2-litre) fermenters showed that good agitation alone is not enough to achieve effective fermentation. Adequate aeration (0.66 to 1.0 VVM) was needed to effectively break down the glucose. However, aeration prevented the production (or build-up) of ethanol.

7. Most of the results obtained during earlier small-scale tests (flasks, small fermenters) were repeated using a 16-litre fermenter. This augurs well for the future.

The results of this first phase are most satisfactory and reflect the high industrial potential of our fermentation process. Our process is relatively fast (100 hours or less), easy to use, and provides significant quantities of the main products (ethanol, 30-37 g/L; glycerol, 38-40 g/L; D-arabitol/D-mannitol mixture, 50-52 g/L). We believe that the process should be developed primarily for the purpose of producing polyols; ethanol production should be considered an added benefit.

Our fermentation process is an excellent example of the conversion of biomass to liquid fuel (ethanol) and chemical products

(polyols) and should, in our view, be further developed and perfected. We suggest that:

1. aerating conditions be improved and airlift fermenters be used in order to ensure greater oxygen transfer;

2. the effect of pH and especially of alkaline conditions on product yield be examined;

3. it be determined whether two-stage fermentation, which would separate the production of microbial biomass and other substances, would be more beneficial than a single-stage process;

4. the appropriateness of using this process in a continuous or semi-continuous fed-batch mode be evaluated; and

5. more realistic substrates such as starch hydrolysates be used.

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: Séparation de certains sucres, de l'éthanol, et de divers polyols par chromatographie liquide sous haute pression ("HPLC")..... 35

FIGURE 2: Influence de la concentration de l'extrait de levure sur la fermentation du glucose par Torulopsis magnoliae ATCC 13782. Résultats à 92 h..... 50

FIGURE 3: Influence de la concentration de l'extrait de levure sur la fermentation du glucose par Pichia farinosa (P. miso) ATCC 20210. Résultats à 92 h..... 51

FIGURE 4: Influence de l'extrait de levure sur la fermentation du glucose par Saccharomyces bisporus var. mellis ATCC 12572. Résultats à 92 h..... 52

FIGURE 5: Influence de l'extrait de levure sur la fermentation du glucose par Saccharomyces bisporus ATCC 22694. Résultats à 147 h..... 53

FIGURE 6: Chromatogramme ("HPLC") montrant les produits de la fermentation du glucose (20%, P/V) par S. bisporus var. mellis ATCC 12572. Résultats à 71 h..... 59

FIGURE 7: Influence du sulfate de magnésium sur la fermentation du glucose (20%) par S. bisporus var. mellis ATCC 12572. Résultats à 73 et 98 h..... 65

FIGURE 8: Influence du chlorure de sodium sur la fermentation du glucose (20%) par S. bisporus var. mellis ATCC 12572. Résultats à 72 et 97 h..... 67

FIGURE 9: Influence du chlorure de potassium sur la fermentation du glucose (20%) par S. bisporus var. mellis ATCC 12572 Résultats à 72 et 97 h..... 69

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

LISTE DES FIGURES (suite)

FIGURE 10: Influence du phosphate de potassium monobasique sur la fermentation du glucose par S. bisporus var. mellis ATCC 12572. Résultats à 73 et 98 h..... 70

FIGURE 11: Influence de l'agitation (sans ajout forcé d'air) sur la fermentation du glucose par S. bisporus var. mellis ATCC 12572..... 76

FIGURE 12: Influence de l'agitation + aération sur la fermentation du glucose par S. bisporus var. mellis ATCC 12572..... 80

FIGURE 13: Fermentation du glucose à l'échelle 16 L par S. bisporus var. mellis ATCC 12572..... 83

FIGURE 14: Fermenteur Chemep modèle CF-11 (capacité 20 L) utilisé pour la fermentation à plus grande échelle..... 88

FIGURE 15: Apparence de la fermentation vers 100 h. Référence: Figure 14..... 89

FIGURE 16: Versatilité (ou adaptabilité) de la fermentation du glucose par la levure osmophile S. bisporus var. mellis ATCC 12572... 107

FIGURE 17: Exemple d'un résultat d'analyse qualitative de certains sucres et polyols par chromatographie sur couche mince de cellulose..... 115

FIGURE 18: Suivi d'une fermentation (Figure 13) par chromatographie sur couche mince de cellulose..... 116

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I: Applications existantes ou potentielles de l'éthanol et des polyols..... 4

TABLEAU II: Production de polyols par les levures osmophiles. Présence de six (6) groupes distincts basée sur le type de polyol(s) produit(s)..... 24

TABLEAU III: Criblage des levures osmophiles. Etape 1: Liste des levures évaluées..... 38

TABLEAU IV: Etape 2 du criblage: Criblage de dix-sept (17) souches de Torulopsis magnoliae..... 42

TABLEAU V: Influence de l'extrait de levure. Composition des milieux de culture employés..... 47

TABLEAU VI: Sélection de la meilleure levure osmophile..... 58

TABLEAU VII: Influence de certains sels minéraux sur le pH des milieux de culture avant et après stérilisation..... 63

TABLEAU VIII: Influence de l'agitation: rendements en éthanol et polyols sur la base du glucose consommé..... 77

TABLEAU IX: Influence de différents niveaux d'aération sur la fermentation. Evolution du pH et mesure du degré d'évaporation..... 79

TABLEAU X: Rendements (g/g) en produits à différents temps durant la fermentation (référence: Figure 13)..... 87

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

INTRODUCTION

Les chocs pétroliers de la décennie 1970-80 ont fait réaliser à beaucoup de gens et d'intervenants économiques que la biomasse sous toutes ses formes représente un immense réservoir d'énergie et de matières premières pour la production de biens et de services. La biomasse a de plus le très grand avantage d'être renouvelable, contrairement au pétrole. La biomasse disponible au Canada prend des formes différentes: il peut s'agir de déchets organiques industriels, forestiers ou alimentaires, ou encore de matières plus nobles comme les amidons de blé ou de maïs et les stocks lignocellulosiques.

Présentement, la situation du pétrole dans la plupart des pays est relativement facile (prix relativement bas, peu de problèmes d'approvisionnement). Selon de nombreux experts, cette situation n'est que temporaire et devrait devenir beaucoup plus difficile d'ici quelques années. La conversion de la biomasse en énergie ou en divers produits chimiques demeure donc toujours de grande actualité.

La biomasse peut remplacer le pétrole de deux façons. D'une part, la biomasse peut être convertie en sources d'énergie remplaçant ainsi les combustibles fossiles; la conversion de biomasse en éthanol ou en méthane en est un exemple. D'autre part, la biomasse peut être transformée en substances chimiques qui autrement seraient produites à partir du pétrole: un exemple de ceci est la transformation de la biomasse en matières premières telles l'acide acétique, le glycérol, le butanol,

l'isopropanol, etc. En quelques mots, la mise au point et l'utilisation de tout procédé permettant la production, à partir d'une biomasse quelconque, soit d'énergie soit de matières premières présentement dérivées en tout ou en partie du pétrole sera une contribution tangible au domaine des énergies renouvelables. Un tel procédé aurait aussi l'avantage d'utiliser soit les déchets organiques industriels ou encore certains surplus agricoles. Toute notre nourriture provient directement ou indirectement de l'énergie solaire: pourquoi ne pourrions-nous pas alors obtenir une partie de nos besoins en énergie ou en matières premières de la biomasse, laquelle est une forme de stockage de l'énergie solaire?

Il y a environ trois ans, le Centre de recherche industrielle du Québec (CRIQ) initia certains travaux sur la production d'éthanol et de polyols par fermentation avec des levures osmophiles. Cette décision était basée sur les faits suivants:

(1) Cette fermentation peut produire plusieurs produits très intéressants:

tels: - <u>l'éthanol</u>: utilisation comme carburant ou comme matière première dans l'industrie chimique;

- <u>divers polyols</u>: (glycérol, i-érythritol, D(+)-arabitol, D-mannitol): utilisation dans l'industrie chimique, alimentaire ou celle des plastiques;

(2) La forte valeur commerciale de la plupart des polyols peut contribuer à abaisser de manière appréciable les coûts de production de l'éthanol;

(3) Les levures osmophiles peuvent tolérer des conditions de pression osmotique élevées, permettant ainsi d'effectuer la fermentation à des concentrations élevées (plus de 20% (P/V)) en substrat. Ceci devrait contribuer à réduire les coûts de récupération des produits, les produits étant théoriquement plus concentrés.

Nous pensons que cette fermentation est un exemple éloquent d'un procédé permettant de transformer la biomasse (sucres) en énergie (éthanol) et en matières premières (polyols). On trouvera au Tableau I une description plus détaillée des produits possibles avec cette fermentation ainsi qu'un aperçu des applications existantes ou potentielles pour ces substances dans diverses industries. Dans le domaine des énergies renouvelables dérivées de la biomasse, il semble que l'emphase est de plus en plus mise sur la production de produits chimiques de spécialité ("specialty chemicals") (Bioprocessing Technology, janvier 1987, pages 4 et 5).

Nos présents travaux sur les levures osmophiles et la production d'éthanol et de polyols sont une conséquence directe de l'excellente recherche fondamentale effectuée dans ce domaine dans les années 1958-1968 par plusieurs équipes de chercheurs (Onishi, 1963; Spencer, 1968; Peterson et coll., 1958). Cette recherche fut quelque peut oubliée pendant un certain nombre

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

TABLEAU I

APPLICATIONS EXISTANTES OU POTENTIELLES
DE L'ÉTHANOL ET DES POLYOLS

SUBSTANCE	PRIX(1)	APPLICATIONS EXISTANTES/POTENTIELLES
Éthanol	0,61$/L(2)	Carburant liquide; matière première pour l'industrie chimique
Glycérol	1,25$/lb(2)	Explosifs; au moins 1500 utilisations différentes dans les aliments, les plastiques, les cosmétiques, etc.
i-érythritol	- (3)	Application possible dans les plastiques et dans l'alimentation comme édulcorant diététique
D-mannitol	4,17$/lb(2)	Résines, plastiques; pharmacie; aliments
D(+)-arabitol	- (4)	Comme édulcorant dans des aliments diététiques; utilisation possible dans les plastiques

(1) $ canadien

(2) Chemical Marketing Reporter, 22/12/86

(3) Marché présentement inexistant mais en développement au Japon

(4) Marché encore relativement limité; prix inconnu

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

d'années mais connaît depuis quelques années un renouveau d'intérêt, comme en font foi les observations suivantes:

(1) un symposium a eu lieu à Paris les 6 et 7 mai 1985 au sujet des polyols (Anonyme, 1985);

(2) la compagnie CPC International Inc. (New-Jersey, USA) a obtenu quatre brevets en Europe en 1985 portant sur la production de certains polyols (i-érythritol, glycérol, ribitol) par fermentation. But de la compagnie: utilisation des polyols avec ou sans purification dans l'industrie des polymères;

(3) la compagnie Nikken Chemicals Co. (Japon) est à mettre au point divers procédés de fermentation pour la production de glycérol, d'arabitol, de mannitol et d'érythritol. L'érythritol, rapporte-t-on, a 80% du pouvoir sucrant du sucrose et serait très hypocalorique; utilisation donc possible dans les aliments diététiques. Études présentement au niveau 400 L (Bioprocessing Technology, mai 1986, p. 7). On parle même d'exportation pour l'année 1987 (Biotechnology, février 1986, p. 105);

(4) en Inde, au moins deux groupes de chercheurs semblent particulièrement intéressés par la production de glycérol avec certaines levures osmophiles (Vijaikishore et Karanth, 1986a et b; Parekh et Pandey, 1985);

(5) une excellente revue sur la production de glycérol par fermentation fut publiée en 1986 (Vijaikishore et Karanth, 1986);

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Nous pensons que la production d'éthanol et de polyols par fermentation offre un potentiel intéressant pour le Canada. Son application industrielle donnerait un carburant liquide (l'éthanol) et divers polyols pour utilisations diverses dans de nombreux domaines. En outre, un tel procédé pourrait permettre une diversification plus accrue dans l'utilisation des divers amidons et ainsi prendre soin d'une partie des excédents de céréales de ce pays.

OBJECTIFS

L'objectif général des travaux présentés dans ce rapport est de démontrer, à l'échelle du laboratoire, le potentiel offert par certaines levures osmophiles pour la production d'éthanol et de divers polyols par fermentation. Ces travaux forment donc la première partie d'une étude de faisabilité de ce procédé, la deuxième partie devant être faite au cours de l'année 1987-88.

Cet objectif général est constitué de plusieurs objectifs spécifiques, qui sont:

(1) suivre la littérature scientifique et compléter notre bibliographie sur les levures osmophiles et les polyols;

(2) collectionner les informations technico-économiques sur la production et l'utilisation des divers polyols produits par les levures osmophiles;

(3) criblage d'un certain nombre (6 à 12) de levures osmophiles afin de sélectionner la levure la plus appropriée pour nos besoins;

(4) recherche d'un bouillon de culture le moins dispendieux possible. Détermination de l'influence de l'extrait de levure et de certains sels sur la fermentation;

(5) mesure de l'influence de l'agitation (sans ajout forcé d'air), et de l'aération, sur cette fermentation.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Il était entendu, dès le départ, que le glucose pur serait le substrat utilisé dans cette partie de notre étude de faisabilité.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

MÉTHODES

CRIQ

MÉTHODES

Milieu de culture

Le milieu de culture employé, sauf indication, était celui de Hajny et coll. (1960) (bouillon Hajny). Sa composition est comme suit:

Ingrédients	Quantité / 1000 mL
- glucose pur	200 g (20%, P/V)
- extrait de levure	10 g*
- urée	1 g
- eau distillée	jusqu'à 1000 mL

* 5 g si la concentration de glucose est 10% au lieu de 20%.

N.B.: mesurer pH (23°C) avant et après stérilisation (121°C, 10-15 minutes) et refroidissement à 23°C

Préparation des inoculums

Les inoculums furent préparés tel que décrit à la page 11, sauf avis contraire. Le milieu gélosé employé pour la maintenance des cultures sous huile minérale à 4°C était le milieu standard YM (Difco) renforcé en glucose (concentration finale en glucose de 2% (P/V)). L'huile minérale utilisée était une préparation commerciale de marque "Nujol" et fut stérilisée à l'autoclave (121°C, 15 minutes) avant emploi.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

PREPARATION DES INOCULUMS

Culture sur gélose inclinée*
et sous huile minérale (4°C)

fil à boucle

Transfert #1

Bouillon Hajny (10% glucose)
(25 mL/fiole de 250 mL,
bouchon-éponge)
Incubation: 25-30°C, 200 rpm
2-3 jours

Transfert #2

Transférer dans bouillon Hajny (20% glucose)
(inoculum = 1,0 mL, 25 mL de bouillon/fiole
de 250 mL, bouchon-éponge)
Incubation: comme ci-haut

INOCULUM

Après une bonne croissance,
utiliser immédiatement ou
encore placer à 4-5°C pendant
quelques heures en attendant
l'inoculation

* milieu YM (Difco) renforcé en glucose (concentration finale, 2% (P/V)).

CRIQ

Analyse des sucres et des produits de la fermentation

Analyse qualitative (voir Annexe "A" pour exemples)

Le glucose (ou autre substrat) et les divers polyols furent qualitativement analysés par chromatographie sur couche mince de cellulose. Ceci fut fait de façon routinière et permettait d'évaluer l'allure générale des fermentations et de sélectionner les échantillons à être analysés quantitativement.

- Matériel requis : - plaques de cellulose (épaisseur 160 m) (# 13255 cellulose - sans indicateur de fluorescence) ("Eastman Chromagram Sheets")
  - mélange de solvants fraîchement préparé fait de: n-butanol - acide acétique - eau distillée (120/30/50, V/V/V)
  - chambre de chromatographie en verre;

- Procédure : - appliquer les échantillons (généralement 1 à 3 µl) sur la couche mince de cellulose avec une microseringue. Laisser sécher.
  - verser le mélange de solvants dans la chambre de chromatographie au moins 30 minutes avant le début de la chromatographie afin de bien saturer l'atmosphère de la chambre.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Afin d'aider cette saturation, il est utile d'apposer des filtres de cellulose sur les deux grandes parois internes de la chambre;

- déposer la plaque de cellulose. Effectuer la chromatographie à température ambiante. Durée: 3-4 heures. Sortir alors la plaque et laisser bien sécher à température ambiante.

Révélation des plaques : - faite par la méthode bien connue employant le nitrate d'argent. Cette méthode est bien décrite à la page 14.

Analyse quantitative

Le glucose (ou autre substrat), l'éthanol et les divers polyols furent quantitativement déterminés par chromatographie en phase liquide sous haute pression ("HPLC"). Au besoin, les échantillons furent dilués avec de l'eau distillée afin de permettre une détermination précise des différentes substances.

- Appareil utilisé: système HPLC Waters comprenant les composantes suivantes:
  - échantillonneur automatique WISP 710 B
  - chauffe-colonne;

CRIQ

RÉVÉLATION DES PLAQUES AVEC LE NITRATE D'ARGENT

(A) Trois réactifs doivent être préparés:

(1) Solution saturée de nitrate d'argent ($AgNO_3$) dans l'acétone anhydre. Préparer d'abord une solution aqueuse saturée en $AgNO_3$ (2g/mL). Ensuite, ajouter 0,05 mL de cette solution saturée par 10 mL d'acétone anhydre.

(2) 0.5 N KOH dans du méthanol anhydre. Dissoudre 28 g de KOH dans environ 0,8 litre de méthanol anhydre et agiter jusqu'à dissolution complète. Compléter le volume à 1 litre.

(3) 5% (P/V) thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$).

(B) Procédure:

(1) Ajouter un volume suffisant de la solution (1) dans un plat (de préférence avec fond ovale) et tremper lentement le chromatogramme (plaque de cellulose) une fois dans un mouvement lent en continu. Faire sécher à plat.

(2) Répéter l'étape (1), utilisant cette fois la solution (2).

(3) Laisser développer la couleur à température ambiante (2 à 5 minutes, ou même plus!). Tremper alors le chromatogramme dans la solution (3). Laisser sécher à température ambiante.

(4) Finalement, tremper le chromatogramme dans de l'eau distillée et laisser sécher à l'air ambiant. L'étape (4) est optionnelle et sert uniquement à blanchir le fond ("background") de la plaque.

Cette méthode donne des taches ("spots") noires ou brunes sur un fond blanchâtre.

(C) Précaution:

La présence d'eau dans l'acétone ou le méthanol donne des résultats inférieurs.

(D) Théorie:

(1) Les substances réductrices apparaissent immédiatement (sensibilité: 1-2 µg);

(2) Les substances faiblement ou non-réductrices (oligosaccharides, méthylglucosides, hexitols, autres polyols) apparaissent plus lentement (sensibilité: 2-10 µg)

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

- Appareil utilisé (suite): - colonne: 300 x 7,8 mm Aminex HPX-87P (Bio-Rad) protégée par une colonne de garde appropriée (Bio-Rad). T°= 75°C;
  - pompe modèle 510 ou modèle M-45
  - réfractomètre modèle R401;
  - contrôleur de système 721;
  - intégrateur-traceur 730.

- Eluant : eau déminéralisée, filtrée (0,22 µm) et dégazée par traitement aux ultrasons sous vide partiel.

- Calibration : méthode externe, faite avec un mélange de sucres, d'éthanol et de divers polyols. Calibration vérifiée quotidiennement.

Préparation des échantillons

Les échantillons (1 à 10 mL) provenant des fermentations furent d'abord centrifugés à température ambiante dans une centrifugeuse International (modèle Centra 4). Les conditions de centrifugation varièrent avec les volumes d'échantillon.

- Pour 1,0 à 1,5 mL: environ 7200 rpm (10 minutes) (petits tubes de plastique);
- Pour 8 à 10 mL : environ 3400 rpm (10-15 minutes) (tubes en verre).

N.B.: avec certains échantillons, la centrifugation fut incomplète et dû être répétée.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Suite à la centrifugation, les surnageants furent soigneusement collectés, placés dans des tubes de verre ou de plastique et placés au congélateur (-18°C) pour analyses ultérieures.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

RÉSULTATS

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

RÉSULTATS

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet seront présentés dans l'ordre suivant:

- mini-revue sur les levures osmophiles et leur potentiel pour la production d'éthanol et de divers polyols;

- mise au point d'une méthode d'analyse de certains sucres, de l'éthanol, et de polyols par chromatographie en phase liquide sous haute pression ("HPLC");

- criblage d'un certain nombre de levures osmophiles;

- influence de l'extrait de levure sur la production d'éthanol et de polyols par certaines levures osmophiles;

- influence de certains sels minéraux sur la fermentation;

- influence de l'agitation et de l'aération.

Il est entendu que seuls les résultats compilés et analysés sont présentés ici. Les données de base recueillies tout au long des travaux sont toutefois disponibles pour consultation, si besoin est.

Mini-Revue

Les levures osmophiles et leur potentiel pour la production d'éthanol et de polyols

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

La "période dorée" de la recherche sur les levures osmophiles se situe à peu près entre les années 1956 et 1968. Les travaux de cette période ont été analysés et résumés dans trois excellentes revues. Celles-ci sont:

- Osmophilic Yeasts par H. Onishi, Adv. Food Res., 12: 53-94 (1963);

- Uses and Products of Yeasts and Yeastlike Fungi par W.J. Nickerson et R.G. Brown, Adv. Appl. Microbiol., 7: 225-272 (1965);

- Production of Polyhydric Alcohols by Yeasts, par J.F.T. Spencer, Progress in Industrial Microbiol., 7: 1-42 (1968).

Nous pensons qu'il ne sert probablement à rien de réviser une littérature qui a déjà été bien analysée. Nous nous contenterons donc de résumer ces trois revues et d'utiliser la littérature plus moderne comme complément d'information.

Levures osmophiles: définition

Le terme osmophile a été introduit par Von Richter en 1912 pour décrire les levures qui sont capables d'une bonne croissance dans des conditions de fortes pressions osmotiques, telles les fortes concentrations de sucre ou de sel (Onishi, 1963).

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Écologie des levures osmophiles

Des levures osmophiles ont été isolées d'un grand nombre d'environnements riches en sucre ou en sel, tels les fruits secs, les jus de fruits concentrés, les miels, le sirop d'érable, les saumures, les viandes salées, la sauce soja, la pâte "miso" (Onishi, 1963), certaines confitures (Ramachandran et Sulebele, 1979), les dattes, les raisins trop mûrs (Parekh et Pandey, 1985), etc. Tokuoka et coll. (1985) ont récemment rapporté la présence de levures osmophiles dans certaines friandises, des concentrés de café, des mélasses, et certaines fleurs.

Mécanisme de résistance aux fortes pressions osmotiques

La raison la plus souvent invoquée pour expliquer la résistance des levures osmophiles aux fortes pressions osmotiques est la production à l'intérieur de la cellule, d'un ou plusieurs polyols servant à contrebalancer la forte pression osmotique présente à l'extérieur de la cellule (Onishi, 1963; Hamada et coll., 1984; Brown, 1974; Edgley et Brown, 1978; Adler et coll., 1985; Nobre et da Costa, 1985; Moran et Witter, 1979; Onishi et Shiromaru, 1984; Parekh et Pandey, 1985). Ces polyols s'accumulent donc à l'intérieur de la cellule et sont par la suite excrétés à l'extérieur. La production de polyols permet aussi de conserver plus d'eau à l'intérieur de la cellule.

Au moins une autre raison a été avancée pour expliquer le comportement spécial des levures osmophiles. Selon Brown (1974), les levures osmophiles possèdent peut-être des protéines

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

spéciales, capables de fonctionner efficacement dans des conditions de fortes pressions osmotiques. Cette hypothèse est intéressante mais n'a pas été jusqu'ici appuyée solidement par des résultats expérimentaux.

Il faut noter que la résistance des levures osmophiles aux fortes pression osmotiques n'est pas universellement applicable à tous les solutés. On trouvera donc des levures résistantes aux sucres, d'autres au chlorure de sodium (NaCl) (Onishi, 1963). Par exemple, chez la levure Saccharomyces rouxii, la résistance aux sucres et au sel varie grandement entre les souches de cette espèce (Onishi, 1963: Tableau II).

Production de polyols

Les divers polyols (glycérol, i-érythritol, D-mannitol, D(+)-arabitol) produits par les levures osmophiles sont des substances quasi-idéales pour la stabilisation de la pression osmotique interne: ce sont des molécules de faible poids moléculaire, neutres, ne possédant pas de groupement réactionnel évident, et ainsi peu portées à affecter le métabolisme normal de la cellule. Le terme "compatible solutes" a été introduit pour décrire de telles substances.

Des études exhaustives effectuées sur les polyols produits par les levures osmophiles a révélé que ces levures peuvent être classées en six (6) groupes distincts sur la base du/des polyol(s) produit(s) durant la fermentation. Cette classification est reproduite au Tableau II. La grande majorité des

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

levures osmophiles ne produisent pas un mais plutôt un mélange de deux ou trois polyols. Pendant longtemps, on a pensé que la séparation et la récupération de ces polyols serait difficile et coûteuse, décourageant ainsi l'application industrielle. En accord avec Vijaikishore et Karanth (1984), nous pensons que ce problème est beaucoup moins décourageant qu'avant, surtout avec la disponibilité de techniques modernes de récupération douces et peu énergivores telles l'osmose inverse, l'ultrafiltration, la chromatographie sur échangeurs d'ions. La compagnie CPC International inc. envisage même la production de polyols par fermentation sans fractionnement des polyols: le mélange de polyols serait récupéré, raffiné ou non, et utilisé dans l'industrie des polymères (de Troostenbergh et coll., 1984).

Facteurs affectant la production de polyols

Beaucoup d'efforts ont été consacrés à déterminer l'influence de nombreux facteurs chimiques ou physiques sur la production des polyols par les levures osmophiles (Onishi, 1963; Spencer, 1968; Nickerson et Brown, 1965). Trois observations générales peuvent être faites:

(1) la production des polyols par les levures osmophiles est très dynamique, répondant positivement ou négativement à l'influence de nombreux facteurs;

(2) dans la plupart des fermentations, il semble y avoir une "compétition" entre la production d'éthanol et celle des polyols;

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

TABLEAU II

PRODUCTION DE POLYOLS PAR LES LEVURES OSMOPHILES
PRESENCE DE SIX (6) GROUPES DISTINCTS BASEE
SUR LE TYPE DE POLYOL(S) PRODUIT(S)

GROUPE	POLYOL (S) PRODUIT (S)	ORGANISMES RESPONSABLES
I	Glycérol	Torulopsis magnoliae
II	D-arabitol	Hansenula subpelliculosa
III	i-érythritol	Trigonopsis variabilis
IV	Glycérol et D-arabitol	Debaryomyces hansenii
V	D-arabitol et i-érythritol	Torulopsis famata Candida polymorpha
VI	Glycérol D-arabitol et i-érythritol	Pichia miso, Debaryomyces mogii

Adapté de Nickerson et Brown (1965).

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

(3) il est très important d'arrêter la fermentation à temps, certains des polyols pouvant servir de substrats aux levures.

Tel que rapporté par Spencer (1968), la production des polyols par les levures osmophiles est sous l'importante influence des trois facteurs suivants (outre les qualités intrinsèques de chaque levure):

- la composition du milieu de culture;
- la température;
- l'aération.

Des recherches plus récentes indiquent que le pH est aussi un facteur très important (Vijaikishore et Karanth, 1984).

Influence de la composition du milieu de culture

L'information disponible à ce sujet est très volumineuse. Nous pouvons toutefois en tirer les conclusions générales suivantes:

(1) il faut rechercher un milieu de culture ne favorisant pas trop la croissance des levures au détriment de la conversion du substrat en polyols. Donc, pas trop d'azote, pas trop de phosphate, etc. Favoriser la croissance des cellules favorise aussi l'utilisation de l'oxygène, ce qui rend les conditions plus anaérobies et accroît la production de l'éthanol aux dépens des polyols (Spencer, 1968);

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

(2) il semble y avoir une compétition entre la production d'éthanol et celle des polyols (Hajny et coll., 1960; Spencer, 1968; Vijaikishore et Karanth, 1986);

(3) le métabolisme des levures osmophiles est très dynamique et ainsi peut se modifier grandement en réponse aux modifications nutritionnelles du milieu de culture. Certains facteurs nutritifs tels la concentration de l'extrait de levure (Peterson et coll., 1958; Hajny et coll., 1960), de certains sels minéraux (Vijaikishore et Karanth, 1984; Spencer, 1968; Ramachandran et Sulebele, 1979), du substrat (Ramachandran et Sulebele, 1979; Spencer, 1968) ou encore de certaines substances minérales (Spencer, 1968; Vijaikishore et Karanth, 1984) peut influencer de façon importante le type de substances produites et leur concentration.

La composition du milieu de culture influence non seulement le métabolisme des levures osmophiles mais aussi les coûts de la fermentation.

Influence de la température

Selon Spencer (1968), la température a une influence importante sur le métabolisme des levures osmophiles et la production de polyols. Cette influence peut se manifester de plusieurs manières:

(1) l'augmentation de la température augmentera généralement

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

la vitesse d'utilisation du substrat et la concentration finale des produits;

(2) l'augmentation de la température serait favorable à la production du glycérol (Spencer, 1968);

(3) l'effet bénéfique de la température ne serait valide qu'à des conditions de concentrations élevées en substrat et deviendrait nul lorsque la concentration en substrat diminue (Spencer, 1968);

Les informations disponibles quant à l'influence de la température sont assez limitées et datent déjà de plusieurs années; il y a pénurie d'informations récentes. En général, la température optimale pour la production des polyols semble se situer entre 30 et 37°C et varie suivant les levures osmophiles, les polyols d'intérêt, et les autres conditions utilisées.

Tel que rapporté par Vijaikishore et Karanth (1986), la conduite de fermentations à des températures plus élevées, à rendement égal, présente l'avantage de réduire sensiblement les coûts de refroidissement des fermenteurs.

Influence de l'aération

Onishi (1963) et Spencer (1968), dans leur revue respective sur les levures osmophiles, ont présenté plusieurs évidences démontrant qu'une bonne aération (c'est-à-dire un approvisionnement adéquat en oxygène) était requise pour la production maximale

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

des polyols. Ceci est quelque peu surprenant car les polyols sont en fait des substances réduites. Nous nous contenterons ici d'offrir au lecteur les observations les plus pertinentes recueillies:

(1) tel que rapporté plus tôt, dans les fermentations avec les levures osmophiles, il semble y avoir une compétition entre la production de l'éthanol et celle des polyols. Une bonne aération serait donc requise afin de réduire la production d'éthanol, ce qui en retour favoriserait la production des polyols (Spencer, 1968). D'après Spencer (1968), la concentration d'éthanol serait un bon critère de l'adéquation ou non des conditions d'aération;

(2) les conditions d'aération peuvent varier en fonction de la concentration du substrat (Peterson et coll., 1958; Hajny et coll., 1960) ou de l'extrait de levure (Onishi et Saito, 1961; Onishi et coll., 1961). Les conditions d'aération ne peuvent donc être absolument fixées;

(3) les conditions d'aération peuvent aussi avoir une grande influence sur le ratio des divers polyols produits (Spencer, 1968; Ramachandran et Sulebele, 1979; Peterson et coll., 1958);

(4) Vijaikishore et Karanth (1986) ont récemment démontré qu'une concentration d'oxygène dissout de 40% saturation et plus était requise pour une bonne production de glycérol et une production minimale d'éthanol.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

L'aération apparaît donc extrêmement importante dans la production des polyols par fermentation: ce paramètre mérite d'être bien étudié et optimisé.

Influence du pH

Il est assez surprenant de constater que l'influence du pH, si fréquemment évaluée dans de nombreuses fermentations, a été assez peu étudiée dans le cas des fermentations employant les levures osmophiles. Quelques observations ont néanmoins été rapportées:

(1) avec Saccharomyces rouxii, l'étendue de la gamme de valeurs de pH permettant une bonne croissance de cette levure est indirectement proportionnelle à la concentration en NaCl du milieu. Par exemple, cette levure peut croître efficacement à des valeurs de pH se situant entre 3,0 et 7,0 lorsque la concentration en NaCl du milieu est de 1 M mais la croissance devient rapidement problématique lorsque la concentration de NaCl est de 3 M: avec cette concentration de sel, seules des valeurs de pH entre 4 et 5 permettent une bonne croissance. Le même effet ne se produit pas avec des fortes concentrations de sucre (glucose) (Onishi, 1963);

(2) Vijaikishore et Karanth (1986) ont récemment démontré que des conditions alcalines (pH 7,1 à 8,2) favorisent grandement la production de glycérol par la levure osmophile Pichia farinosa. Les conditions alcalines étaient obtenues

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

par l'ajout graduel de carbonate de sodium ou de sulfite de sodium durant la fermentation. Nous ne pouvons dire si cet effet est dû uniquement au pH alcalin ou encore à la présence de fortes concentrations de carbonate, sulfite, ou de sodium dans le milieu.

L'influence du pH sur le métabolisme des levures osmophiles mérite certes d'être étudiée plus à fond.

Potentiel industriel des levures osmophiles

Nous ne sommes évidemment pas les premières personnes à envisager l'emploi de certaines levures osmophiles pour la production d'éthanol et de certains polyols. Cet intérêt s'est manifesté par la prise de plusieurs brevets (par exemple: de Troostenbergh et coll., 1985; Onishi et Suzuki, 1971; Trevelyan, 1961; Graham, 1961; Onishi, 1961; Watanabe et coll., 1986). Les points suivants ne font pas de doute:

(1) ces fermentations peuvent être relativement rapides (120 h et moins);

(2) la conversion du substrat en produit(s) (éthanol et/ou divers polyols) peut être très importante, de l'ordre de 40 à 60% (en poids) du substrat disponible (Trevelyan, 1961; Hajny et coll., 1964; Onishi et Saito, 1962; Onishi et Suzuki, 1970; Vijaikishore et Karanth, 1986; Onishi, 1963);

(3) ces fermentations sont relativement faciles de conduite.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Malgré ces caractéristiques très intéressantes, on peut se demander pourquoi quelques unes de ces fermentations ne sont pas devenues des procédés industriels rentables. Nous pensons avoir identifié trois raisons principales pour cet état de fait:

(1) la "peur" d'avoir de trop gros problèmes avec le fractionnement et la purification des polyols;

(2) le peu de débouchés alors pour certains des polyols produits (exemple: i-érythritol et D-arabitol);

(3) l'abondance et le bas prix du pétrole et de ses dérivés.

Bien des choses ont changé depuis environ trente ans: de nouvelles techniques de fractionnement et de récupération des produits sont apparues et de nouveaux débouchés prometteurs ont été découverts pour les polyols i-érythritol et D-arabitol (voir Tableau I). De plus, les réserves de pétrole s'amenuisent assez dangereusement et son prix augmente régulièrement. Le contexte a donc beaucoup changé et est devenu beaucoup plus favorable pour ces fermentations. La preuve de tout ceci est que plusieurs laboratoires industriels sont présentement en train d'optimiser certaines de ces fermentations (Vijaikishore et Karanth, 1986; Anonyme, 1986; Watanabe et coll., 1986; de Troostenberg et coll., 1985; Parekh et Pandey, 1985).

L'avenir apparaît donc très prometteur pour certaines de ces fermentations.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Optimisation

Analyse quantitative de certains sucres, de l'éthanol et de divers polyols par chromatographie en phase liquide sous haute pression ("HPLC")

Analyse quantitative de certains sucres,
de l'éthanol et de divers polyols

Nous avons profité de ce projet pour améliorer notre méthode d'analyse quantitative des sucres, de l'éthanol et de polyols employant la chromatographie liquide sous haute pression ("HPLC"). Ces travaux visaient surtout à améliorer la séparation entre certaines des substances d'intérêt. Les travaux effectués visaient à:

(1) déterminer l'influence du débit (0,3 à 0,6 mL/min) et de la température (75 à 91°C) sur la qualité de la séparation entre les substances d'intérêt et la précision de la quantification;

(2) vérifier si la méthode sélectionnée est très reproductible.

Suite à ces travaux, les conclusions suivantes furent tirées:

(1) le débit fut fixé à 0,5 mL/min (un bon compromis entre la qualité de la chromatographie et sa rapidité!);

(2) la température de la colonne fut abaissée à 75°C (auparavant 85°C); c'est à cette température que les meilleures séparations chromatographiques furent obtenues.

On trouvera à la Figure 1 un exemple d'un résultat typique de chromatographie obtenue suite aux nouvelles conditions

d'opération. Cette nouvelle méthode, toutefois, souffre encore de deux faiblesses:

(1) la méthode ne peut séparer complètement les polyols glycérol et i-érythritol: des tests ont cependant démontré que ceci n'empêchait pas la quantification précise de ces deux polyols;

(2) la méthode ne peut séparer les polyols D(+)-arabitol et D-mannitol, malgré les efforts déployés. Nous sommes donc forcés pour le moment présent à rapporter les résultats obtenus comme un mélange de D(+)-arabitol et de D-mannitol.

Cette méthode d'analyse est très précise et reproductible. Il faut toutefois calibrer l'appareil régulièrement (au moins une fois par jour). Nous avons évalué la précision des analyses à $\pm$ 2% et très souvent à $\pm$ 1%. Les temps de rétention peuvent cependant varier sensiblement d'un jour à l'autre.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

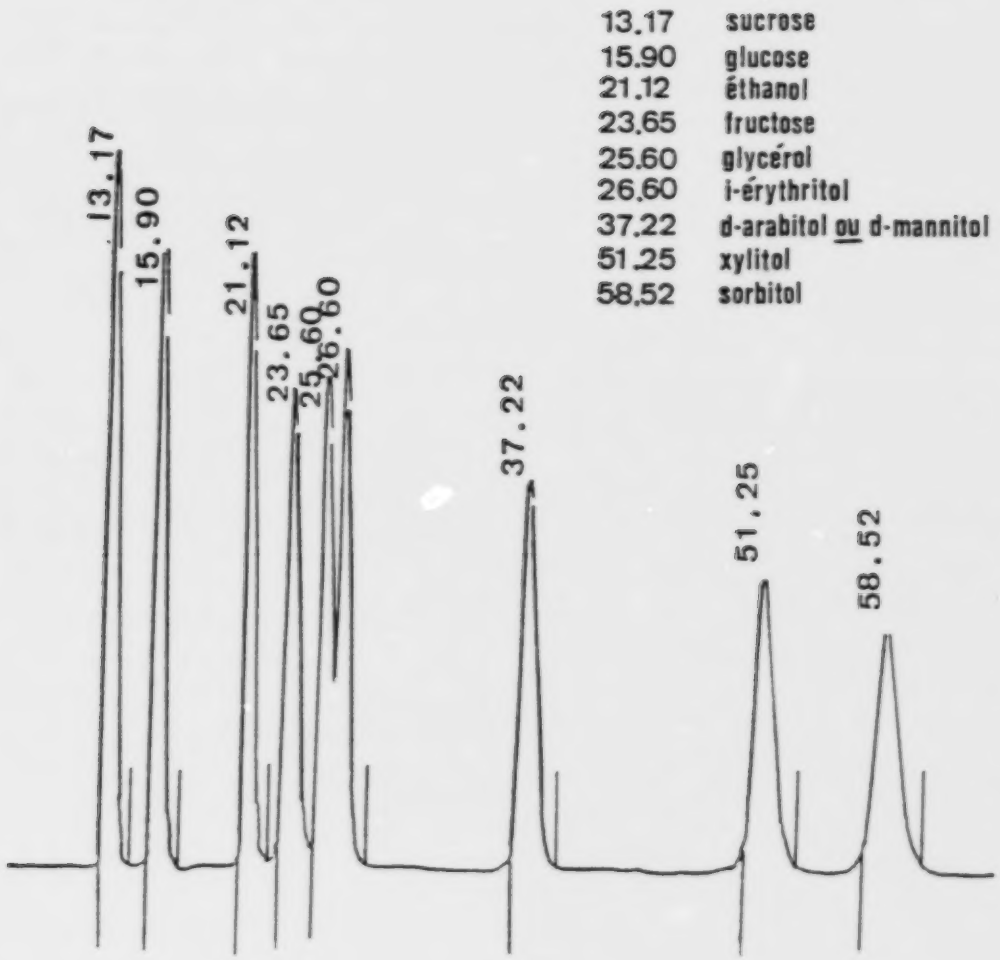


FIGURE 1: Séparation de certains sucres, de l'éthanol, et de divers polyols par chromatographie liquide sous haute pression ("HPLC"). Colonne: Aminex HPX-87P (Bio-Rad); Température: 75°C; Éluant: eau, à 0,5 mL/min. Voir la section Méthodes pour plus de détails.

Criblage

Criblage ("screening") d'un certain nombre de levures osmophiles

CRIQ

Criblage ("screening") d'un certain nombre de levures osmophiles

N.B.: ce criblage fut effectué en deux étapes.

Étape 1: Les travaux de l'étape 1 furent effectués à l'extérieur de ce projet et bien avant que ce projet ait débuté. Nous pensons toutefois qu'il serait très utile de décrire brièvement ces travaux:

(1) dix-neuf (19) souches de levures, toutes des levures osmophiles sauf pour Saccharomyces cerevisiae NCYC 200 (Sternberg 675), furent évaluées quant à leur potentiel de production de polyols à partir de glucose. On trouvera la liste de ces levures au Tableau III. Cette évaluation fut qualitative, employant la chromatographie sur couche mince de cellulose;

(2) les meilleures levures (14 souches) furent aussi évaluées quant à leur potentiel de production de polyols à partir cette fois-ci de sucrose et de divers autres substrats à base de sucrose tels la mélasse, le sucrose impur (sucre brun), et le jus clair de betterave à sucre. Ces analyses furent qualitatives et quantitatives.

Ces travaux ont permis d'établir les conclusions suivantes:

(1) les quatre souches de levures osmophiles les plus intéressantes semblaient être Torulopsis magnoliae ATCC 13782,

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

TABLEAU III

Criblage des levures osmophiles - Étape 1
Liste des levures évaluées

LEVURE	COLLECTION ET NUMÉRO	
- *Saccharomyces rouxii*	ATCC(1)	13356
- *S. rouxii*	ATCC	2623
- *S. rouxii* (*Z. rugosus*)	ATCC	8383
- *Saccharomyces bisporus* var. *mellis*	ATCC	12572
- *Torulopsis candida* (*T. famata*)	ATCC	20214
- *Torulopsis candida*	ATCC	36584
- *Kluyveromyces thermotolerans* (*T. dattila*)	ATCC	20309
- *Saccharomyces bailii* (*Z. acidifaciens*)	ATCC	8766
- *Torulopsis magnoliae*	ATCC	12573
- *T. magnoliae*	ATCC	13782
- *Pichia farinosa* (*P. miso*)	ATCC	20210
- *Saccharomyces bisporus*	ATCC	22694
- *Issatchenkia orientalis* (*P. orientalis*)	ATCC	22692
- *Torulopsis versatilis* (*T. anomala*)	ATCC	20222
- *Candida diddensii*	ATCC	20213
- *Torulospora hansenii*	ATCC	20212
- *Zygosaccharomyces rouxii* (*Z. rugosus*)	NCYC(2)	581
- *Z. rouxii* (*Z. nadsonii*)	NCYC	583
- *Saccharomyces cerevisiae* (Sternberg 675)(3)	NCYC	200

(1) ATCC: American Type Culture Collection (E.U.)
(2) NCYC: National Collection of Yeast Cultures (Angleterre)
(3) Probablement pas une levure osmophile

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Pichia farinosa (P. miso) ATCC 20210, Saccharomyces bisporus var. mellis ATCC 12572 et Saccharomyces bisporus ATCC 22694;

(2) la capacité des levures osmophiles testées (13 souches) à fermenter efficacement le sucrose est assez peu répandue (3 souches sur 13); les souches positives sont Torulopsis candida ATCC 36584, Kluyveromyces thermotolerans ATCC 20309 et Torulopsis magnoliae ATCC 13782;

(3) des tests plus poussés effectués avec la levure Torulopsis magnoliae ATCC 13782 ont confirmé que cette levure peut fermenter efficacement non seulement la sucrose pur mais aussi le sucrose impur (sucre brun) et le jus clair de betterave à sucre. La mélasse, elle, fut difficilement fermentée et pose encore certains problèmes.

Étape 2: Cette étape était prévue dans notre plan de travail original (phase II, item (a)). Les résultats de l'étape 1 ayant démontré le potentiel prometteur de la levure Torulopsis magnoliae ATCC 13782, nous avons voulu vérifier le potentiel offert par d'autres souches de T. magnoliae obtenues de diverses collections. Dix-sept souches furent ainsi évaluées. Les conditions d'évaluation étaient les suivantes:

a) tous les inoculums furent préparés dans du bouillon Hajny (10% glucose) à 28-30°C (200 rpm);

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

b) expérience commencée par l'ajout de 1,0 mL de l'inoculum à chacune d'une série de 5 ou 6 fioles Erlenmeyer de 250 mL (bouchon-éponge) contenant 25 mL de bouillon Hajny (20% glucose). Une des fioles fut immédiatement placée à 5°C (temps 0) pour échantillonnage ultérieur alors que les autres fioles furent incubées à 35°C (250 rpm);

c) après chaque période de 24 heures environ, une fiole pour chaque série était retirée et immédiatement utilisée pour l'échantillonnage. La préparation des échantillons pour les analyses chromatographiques a été décrite dans la section MÉTHODES.

Pour cette expérience, et dans la grande majorité des expériences subséquentes, nous avons adopté la procédure suivante pour l'analyse de la consommation du substrat et de l'accumulation des divers produits (éthanol, polyols):

(1) dans la plupart des cas, tous les échantillons (surnageants) d'une fermentation furent d'abord soumis à la chromatographie sur couche mince de cellulose (voir MÉTHODES: analyse qualitative). Ceci nous permettait d'évaluer globalement et ce, de façon qualitative, le déroulement de la fermentation et de sélectionner les échantillons devant être soumis à la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC, analyse quantitative);

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

(2) analyse quantitative par HPLC des échantillons sélectionnés. Cette analyse fut généralement effectuée en deux étapes, employant habituellement deux dilutions différentes de chaque échantillon, afin d'accommoder la grande différence entre la concentration de glucose et celle des produits dans la plupart des échantillons.

Les résultats obtenus dans cette deuxième étape du criblage sont présentés dans le Tableau IV. Ceux-ci indiquèrent que:

(1) la consommation de glucose fut généralement très bonne sauf pour les souches CBS-6424, CBS-6425 et NCYC-38;

(2) de grandes variations furent obtenues quant à la proportion des divers produits offerte par chacune des souches;

(3) les meilleurs producteurs d'éthanol furent les souches IFO-0661, CBS-6201, NCYC-742 et NCYC-763;

(4) les meilleurs producteurs de glycérol furent les souches CBS-6396 et ATCC-38619. En général, la production de glycérol fut quelque peu décevante;

(5) certaines souches produisirent des quantités appréciables du polyol i-érythritol (>15 g/L): ces souches sont CBS-6424, CBS-6425 et NCYC-764;

(6) la souche NCYC-764 sembla produire un peu de sorbitol (6,8 g/L).

(7) les meilleurs producteurs du mélange D-arabitol + D-mannitol furent sans contredit les souches IFO-0705, CBS-2677, CBS-6396 et NCYC-765. Avec ces quatre souches, la concentration du mélange D-arabitol + D-mannitol fut supérieure à 60 g/L.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

TABLEAU IV

Étape 2 du criblage: criblage de
dix-sept(17) souches de Torulopsis magnoliae

SOUCHE(1)	ECHANTILLON	GLUCOSE(2) FERMENTÉ (g/L)	CONCENTRATION(3) DES PRODUITS (g/L):			
			ETHANOL	GLYCÉROL	I-ÉRYTHRITOL	D-ARABITOL + D-MANNITOL
IFO-0661	99 h	200	41,8	5,25	0	16,7
IFO-0705	71 h	200	24,6	0	1,1	66,0
CBS-2250	99 h	171	16,6	7,8	2,7	39,3
CBS-6201	71 h	197,5	47,6	6,6	0	15,65
CBS-3086	99 h	199	24,2	8,7	6,7	28,6
CBS-2800	99 h	165	28,6	4,65	0	43,9
CBS-2677	99 h	200	15,7	0	3,75	67,35
CBS-6396	71 h	189	20,2	15,0	0	63,2
CBS-6424	99 h	115	0	0	28,8	14,0
CBS-6425	99 h	144	1	3,6	18,1	14,3
NYYC-742	71 h	200	45	4,2	2,4	27,4
NCYC-38	71 h	131	25	2,25	1	2,8
NCYC-763	71 h	185	55,0	5,85	0	1
NCYC-765	99 h	200	28,0	1	0	64,6
NCYC-764(4)	71 h	200	26,4	0	28,3	2,85
ATCC-38619	71 h	200	36,4	12,1	0	49,1
ATCC-42811	99 h	171	29,0	3,3	3,90	19,7

(1) IFO = Institute for Fermentation, Osaka (Japon)
CBS = Centraalbureau Voor Schimmelcultures (Hollande)
NCYC= National Collection of Yeast Cultures (Angleterre)
ATCC= American Type Culture Collection (E.U.)
(2) Concentration initiale en glucose: 200 g/L
(3) Détermination par chromatographie liquide sous haute pression ("HPLC")
(4) NCYC-764: Production possible de sorbitol (6,8 g/L)

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Sélection des souches

Malgré les résultats intéressants de l'étape 2 du criblage, il fut décidé de continuer les travaux, pendant un certain temps du moins, avec les quatre souches sélectionnées à l'étape 1. Celles-ci sont:

- Torulopsis magnoliae ATCC 13782
- Pichia farinosa (P. miso) ATCC 20210
- Saccharomyces bisporus var. mellis ATCC 12572
- Saccharomyces bisporus ATCC 22694.

La décision finale, quant à la levure osmophile à privilégier, sera prise suite aux résultats de la prochaine expérience.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Influence de l'extrait de levure

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Les milieux de culture utilisés jusqu'ici contenaient une concentration assez élevée d'extrait de levure (0,5% (P/V) pour 10% glucose, 1,0% pour 20% glucose). Une telle concentration en extrait de levure a deux désavantages importants:

(1) l'extrait de levure est un ingrédient dispendieux;

(2) l'extrait de levure, à forte concentration, peut favoriser la production de l'éthanol au détriment des polyols (peut être un avantage lorsque l'éthanol est préféré aux polyols!) (Onishi, 1963).

Nous avons donc cherché à évaluer l'influence de l'extrait de levure sur le métabolisme des quatre souches de levures osmophiles sélectionnées précédemment. Cette expérience avait deux objectifs principaux:

(1) définir la concentration minimale d'extrait de levure requise pour obtenir des fermentations efficaces;

(2) nous aider à effectuer le choix final de la levure osmophile pour la suite des travaux.

Préparation des divers milieux de culture

La composition des divers milieux de culture employés pour cette expérience est décrite dans le Tableau V. La concentration du glucose fut fixée à 20% (P/V) et celle de l'urée à 0,1% (P/V). Il est bien connu qu'une partie de l'urée se décompose

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

en ammoniac durant la stérilisation, ce qui augmente l'alcalinité du milieu (voir Tableau V, résultats avec les milieux A et B). Nous avons observé, toutefois, que le pH n'augmente pas dans le cas des milieux contenant 1,0 et 1,5% d'extrait de levure (milieux C et D); le pH diminua même légèrement dans le cas du milieu D. Deux raisons, d'après nous, peuvent expliquer ce phénomène:

(1) une forte concentration en extrait de levure empêche la dégradation de l'urée en ammoniac;

(2) l'alcalinité produite par la dégradation de l'urée est neutralisée par certaines substances présentes dans l'extrait de levure.

Inoculation et conditions d'incubation

Tous les inoculums requis pour cette expérience furent préparés dans du bouillon Hajny (20% glucose). L'expérience fut faite comme suit:

(1) six (6) fioles (25 mL de milieu/fiole Erlenmeyer de 250 mL) furent inoculées (inoculum: 1,0 mL) pour chaque milieu et chaque souche de levure (4 milieux différents x 4 souches de levure);

(2) immédiatement après l'inoculation, une fiole de chaque série de six fut placée à 5°C (temps 0). Ces fioles furent échantillonnées un peu plus tard;

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

TABLEAU V

Influence de l'extrait de levure
Composition des milieux de culture employés

	QUANTITÉ/1000 mL DE MILIEU:			
SUBSTANCE / MILIEU	A	B	C	D
. Glucose	200 g	200 g	200 g	200 g
. Extrait de levure	2,5 g	5,0 g	10 g	15 g
. Urée	1,0 g	1,0 g	1,0 g	1,0 g
. Eau distillée, jusqu'à	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL
Concentration finale d'extrait de levure	0,25 %	0,50 %	1,0 %	1,5 %
pH (23°C) avant et après stérilisation à l'autoclave:				
- avant	5,70	5,88	6,07	6,14
- après	6,77	6,47	6,07	5,96
Distribution:	- 25 mL dans des fioles Erlenmeyer de 250 mL (bouchon-éponge) - stérilisation: 121°C - 10 minutes			

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

(3) le reste des fioles fut incubé comme suit:
- 35°C
- 250 rpm
- incubateurs New Brunswick Sci. (modèle Psycrotherm).

Les échantillons furent pris, conservés et analysés tel que décrit précédemment dans la section METHODES. Les divers échantillons furent analysés comme suit:

a) analyse qualitative de tous les échantillons par chromatographie sur couche mince de cellulose afin d'obtenir une évaluation du déroulement de chacune des fermentations;

b) analyse quantitative d'échantillons sélectionnés par chromatographie liquide sous haute pression ("HPLC").

Seuls les résultats des analyses quantitatives seront présentés ici (Figures 2 à 5). L'extrait de levure affecta la fermentation de plusieurs façons:

Influence sur la consommation du glucose

1) en général, l'augmentation de la concentration en extrait de levure favorisa grandement la consommation de glucose: ceci fut très évident avec T. magnoliae ATCC 13782, P. farinosa (P. miso) ATCC 20210 et S. bisporus var. mellis ATCC 12572 mais moins évident avec S. bisporus ATCC 22694;

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

(2) dans tous les cas, une concentration d'extrait de levure de 1,0% (P/V) sembla très appropriée pour favoriser la consommation du glucose; il ne serait pas vraiment avantageux d'en utiliser plus dans le seul but d'accélérer la consommation de glucose.

Influence sur la production d'éthanol

L'influence de l'extrait de levure doit être évaluée avec beaucoup de soins:

(1) en général, la production (ou l'accumulation!) d'éthanol fut plus ou moins proportionnelle à la concentration d'extrait de levure et à la quantité de glucose consommée;

(2) il était évident qu'une partie importante de l'éthanol produit pouvait être consommée par les levures sous certaines conditions. Ces conditions favorables à l'utilisation de l'éthanol apparaîtraient lorsque:

- la consommation du glucose est terminée ou presque et qu'il ne reste donc plus de substrat disponible (voir évidences présentées dans les Figures 2 à 5);

- la consommation du glucose est lente. Par exemple, en examinant les Figures 2 et 4, on réalise que l'accumulation d'éthanol était nulle à 92 h pour les fermentations contenant 0,25 et 0,50% (P/V) d'extrait de levure. Toutefois, des analyses effectuées sur des échantillons plus jeunes (47 h à 72 h) ont prouvé qu'un peu d'éthanol

CRIQ

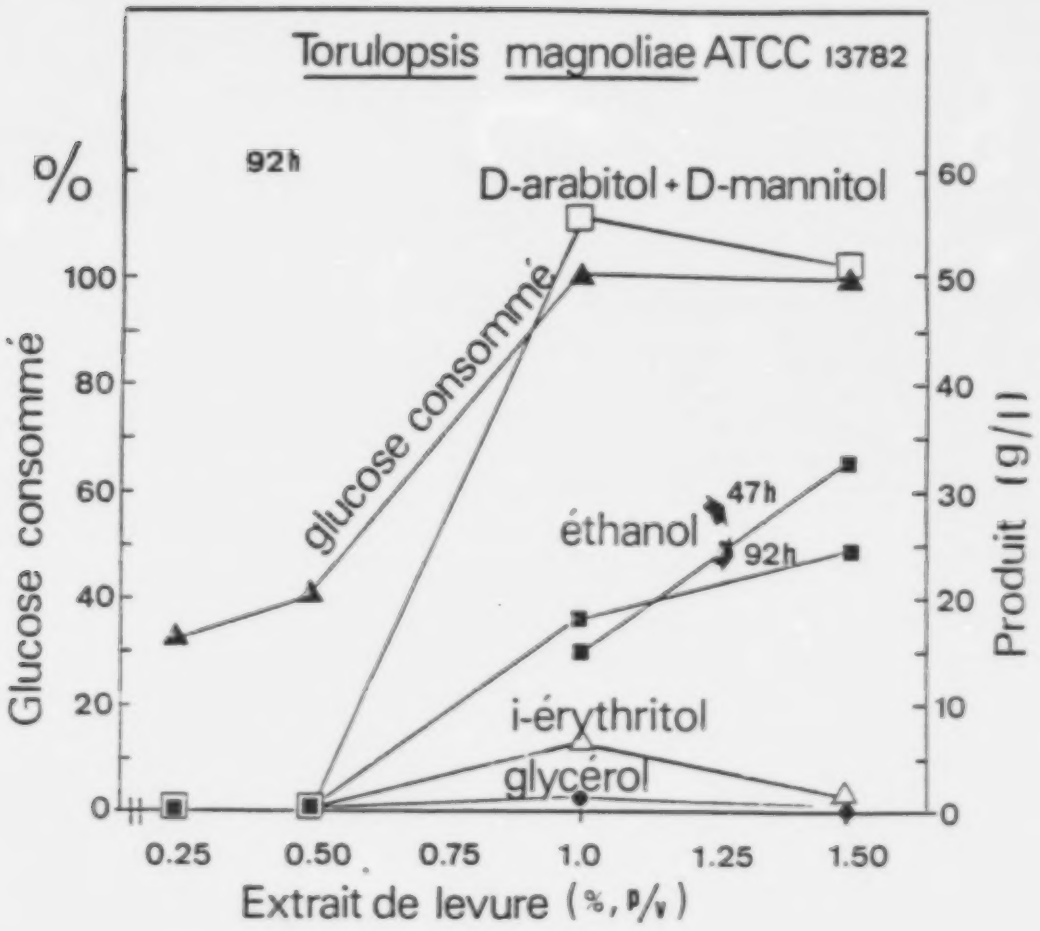


FIGURE 2: Influence de la concentration de l'extrait de levure sur la fermentation du glucose par Torulopsis magnoliae ATCC 13782. Résultats à 92 h. Certains résultats pour l'éthanol à 47 h sont aussi présentés.

CRIQ

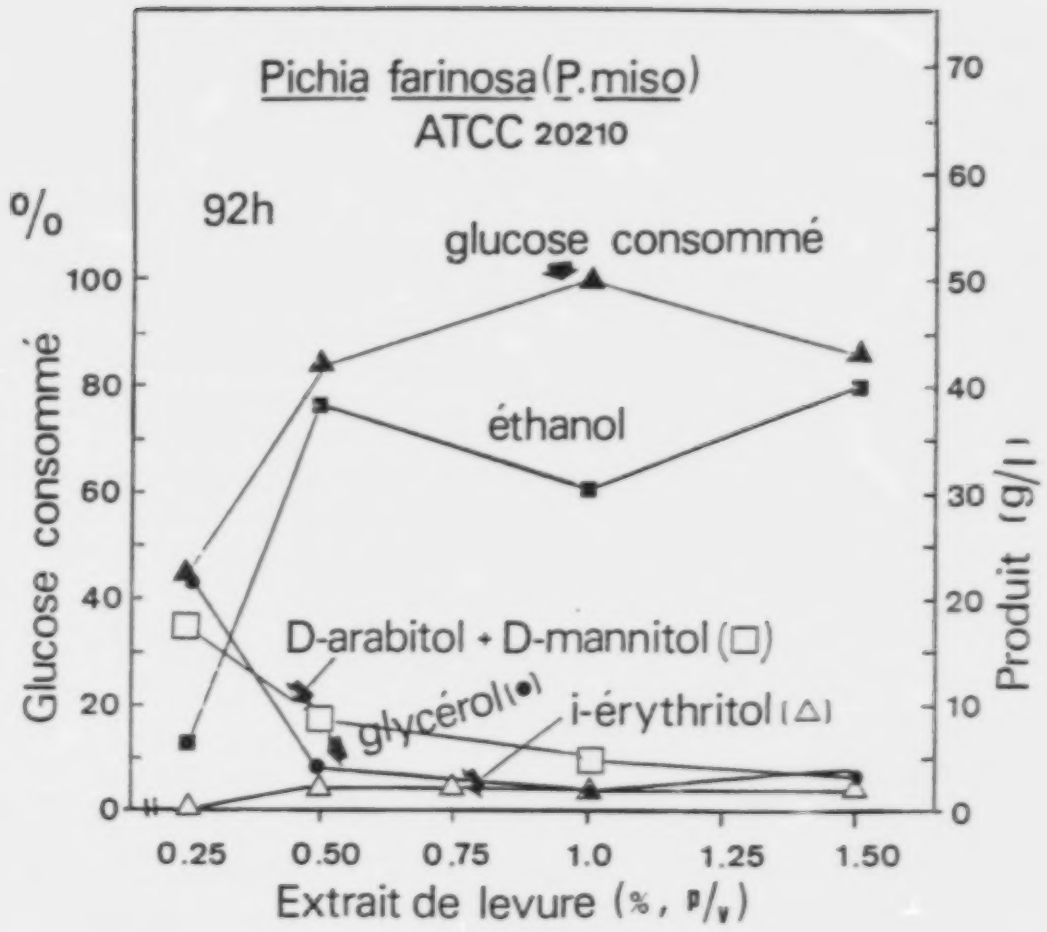


FIGURE 3: Influence de la concentration de l'extrait de levure sur la fermentation du glucose par Pichia farinosa (P. miso) ATCC 20210. Résultats à 92 h.

CRIQ

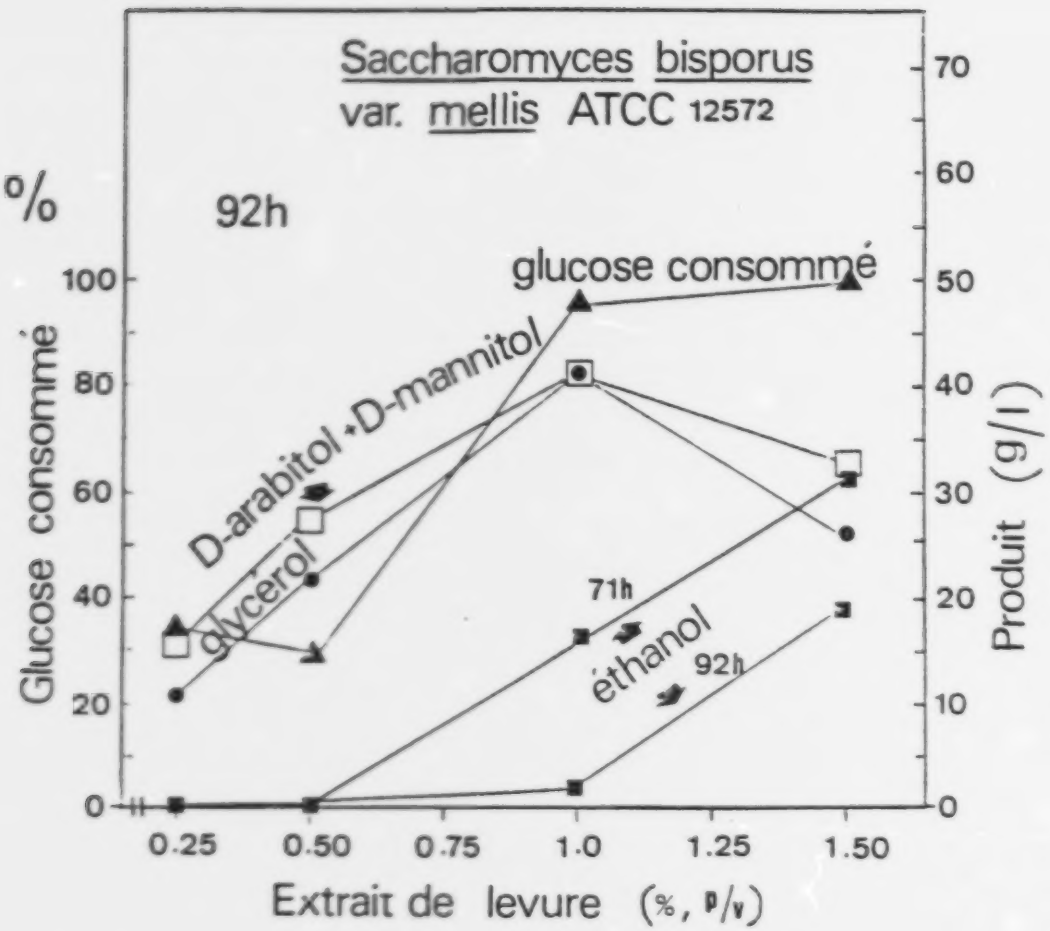


FIGURE 4: Influence de l'extrait de levure sur la fermentation du glucose par Saccharomyces bisporus var. mellis ATCC 12572. Résultats à 92 h. Certains résultats pour l'éthanol à 71 h sont aussi présentés.

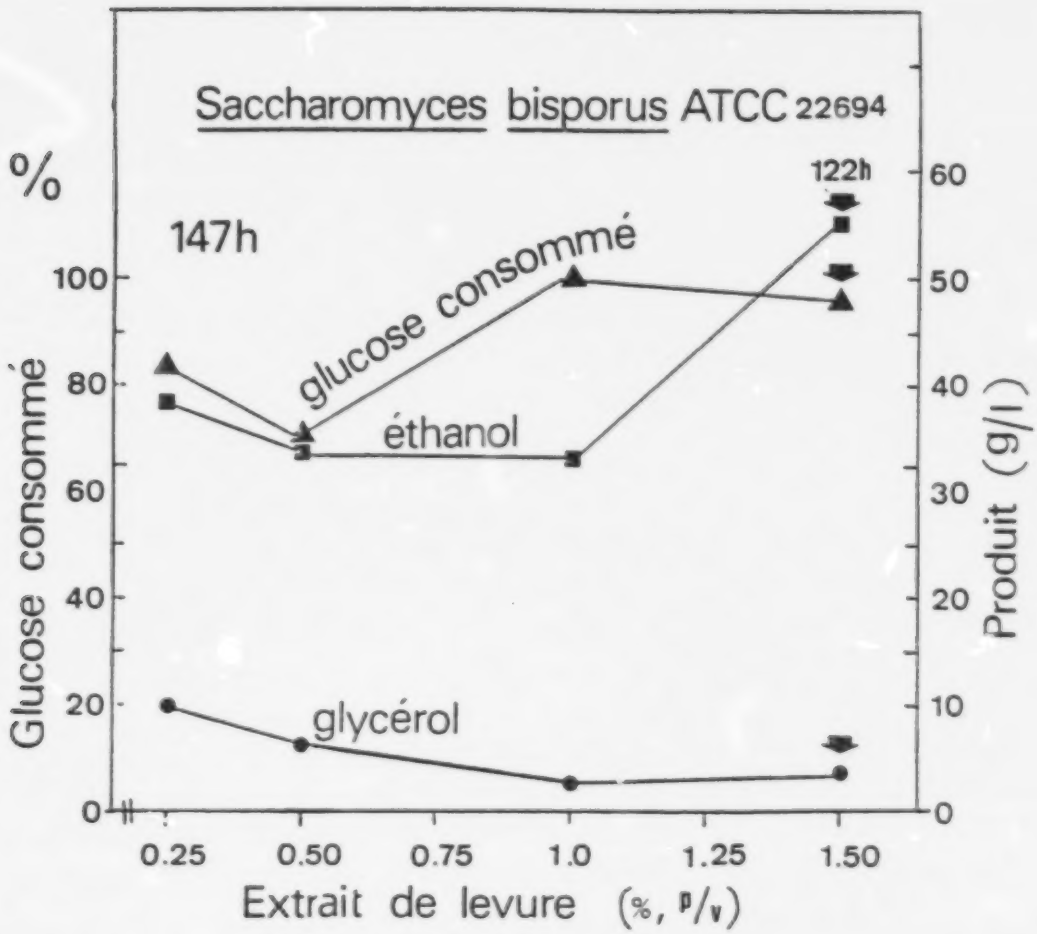


FIGURE 5: Influence de l'extrait de levure sur la fermentation du glucose par Saccharomyces bisporus ATCC 22694. Résultats à 147 h. Résultats à 122 h pour la concentration de 1,5% (p/v) en extrait de levure.

CRIQ

était produit durant ces fermentations mais que cet éthanol était consommé plus tard durant la fermentation (résultats non présentés mais disponibles).

Influence sur la production du glycérol

(1) avec la levure Pichia farinosa ATCC 20210, l'augmentation de la concentration d'extrait de levure fut très nuisible à la production de glycérol (Figure 3). La meilleure production de glycérol fut obtenue avec une concentration en extrait de levure de 0,25% (P/V), malgré le fait que seulement 45% du glucose avait été utilisé. On peut penser qu'une certaine partie de la baisse en glycérol fut due à la consommation de glycérol par les levures une fois le glucose disparu ou presque. Des résultats très semblables furent aussi obtenus avec S. bisporus ATCC 22694 (Figure 5);

(2) avec la levure S. bisporus var. mellis ATCC 12572 (Figure 4), la production de glycérol fut directement proportionnelle à la concentration d'extrait de levure pour des concentrations en extrait de 0,25 à 1,0% (P/V): la production accrue de glycérol fut probablement due uniquement à une meilleure consommation du glucose. La baisse de production de glycérol observée avec une concentration d'extrait de levure de 1,5% était probablement due seulement à la consommation de glycérol par les levures une fois tout le glucose consommé;

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

(3) la levure T. magnoliae ATCC 13782 étant un très pauvre producteur de glycérol, rien ne peut être dit sur l'influence de l'extrait de levure sur la production de glycérol par cette levure.

Influence sur la production de l'i-érythritol

Des quatre levures évaluées, seules T. magnoliae ATCC 13782 et P. farinosa ATCC 20210 donnèrent des quantités mesurables d'i-érythritol. Voici ce qui peut être rapporté de l'influence de l'extrait de levure sur la production de ce polyol:

(1) les quantités d'i-érythritol produites par P. farinosa ATCC 20210 furent tellement faibles (2 g/L et moins) que rien ne peut être conclu sur l'influence de l'extrait de levure sur la production d'i-érythritol par cette levure (Figure 3);

(2) avec T. magnoliae ATCC 13782, la production maximale d'i-érythritol mesurée fut de 6,5 g/L et fut obtenue avec une concentration d'extrait de levure de 1,0% (P/V); l'effet apparent de l'extrait de levure était probablement une conséquence directe d'une meilleure consommation du glucose (Figure 2);

(3) T. magnoliae ATCC 13872 montra aussi des signes d'utilisation de l'i-érythritol une fois tout le glucose fermenté (Figure 2).

CRIQ

Influence sur la production du mélange D-arabitol + D-mannitol

(1) l'extrait de levure fut en général très bénéfique à la production du mélange D-arabitol + D-mannitol avec les levures T. magnoliae et S. bisporus var. mellis; cet effet bénéfique est probablement dû uniquement à une plus grande utilisation du glucose (Figures 2 et 4);

(2) avec P. farinosa, l'effet contraire fut observé. En effet, l'augmentation de l'extrait de levure fut très nuisible à la production du mélange D-arabitol + D-mannitol (Figure 3);

(3) S. bisporus ATCC 22694 n'ayant pas produit de D-arabitol et/ou de D-mannitol, rien ne peut être dit sur l'influence possible de l'extrait de levure (Figure 5);

(4) tout comme d'autres produits de ces fermentations, le mélange D-arabitol + D-mannitol fut partiellement consommé dans certains cas, une fois tout le glucose utilisé (Figures 2 et 4);

Conclusion préliminaire

Une fois tous les résultats de cette expérience bien considérés, il fut décidé de continuer à utiliser, pour un certain temps du moins, une concentration finale en extrait de levure de 1% (P/V), malgré le coût élevé de cette substance.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Sélection de la meilleure levure osmophile

La sélection de la meilleure levure osmophile, parmi les quatre levures précédemment évaluées, fut effectuée suite à l'expérience portant sur l'influence de l'extrait de levure. Cette sélection fut faite selon les critères et résultats présentés au Tableau VI. La levure choisie fut Saccharomyces bisporus var. mellis ATCC 12572. La suite du projet sera complétée en utilisant uniquement cette levure comme microorganisme.

On trouvera à la Figure 6 copie d'un chromatogramme montrant les principaux produits fournis par S. bisporus var. mellis ATCC 12572 après fermentation du glucose.

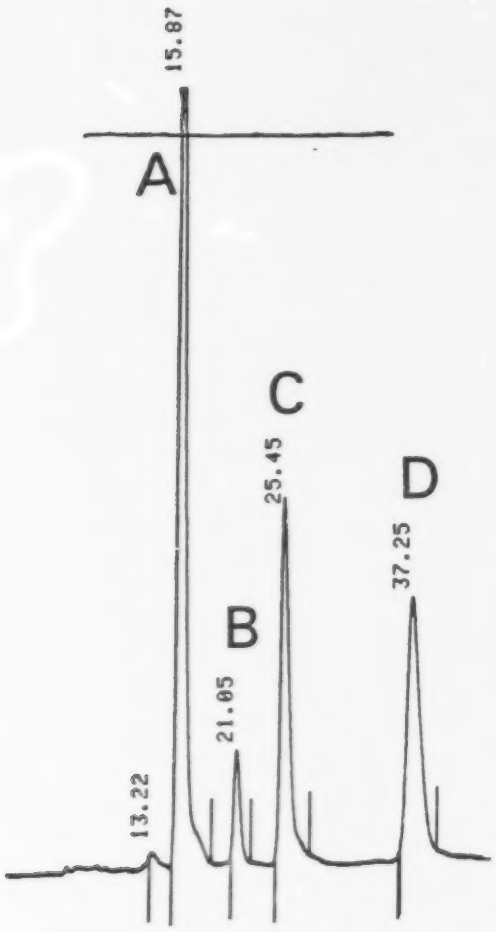
CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

TABLEAU VI

Sélection de la meilleure levure osmophile

CRITERES CHOISIS	*T. magnoliae* ATCC 13782	*P. farinosa* ATCC 20210	*S. bisporus* var. *mellis* ATCC 12572	*S. bisporus* ATCC 22694
Fermentation rapide de 20% glucose (100 h et moins)	oui	oui	oui	non
Production appréciable de glycérol	non	non	oui	non
Production appréciable d'éthanol	oui	oui	oui	oui
Production appréciable du mélange D-arabitol + D-mannitol	oui	non	oui	non
Production d'un mélange intéressant d'éthanol, de glycérol, de D-arabitol et/ou de D-mannitol	non	non	oui (sélection finale)	non

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC



PIC	NATURE	g/L
A	Glucose	70
B	Ethanol	16,4
C	Glycérol	34,9
D	D-arabitol + D-mannitol	32,9

FIGURE 6: Chromatogramme ("HPLC") montrant les produits de la fermentation du glucose (20%, P/V) par S. bisporus var. mellis ATCC 12572. Résultats à 71 h (concentration d'extrait de levure: 1,0% (P/V))

Incubation: 35°C, 250 rpm

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Influence de certains sels minéraux

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Il était important, à ce stade-ci des travaux, de mesurer l'influence de quelques sels minéraux communs sur le métabolisme de S. bisporus var. mellis. Deux raisons principales peuvent être invoquées:

(1) certains sels minéraux peuvent affecter grandement le métabolisme de certaines levures osmophiles (Spencer, 1968; Onishi, 1963; Hajny et coll., 1960; Vijaikishore et Karanth, 1984; Ramachandran et Sulebele, 1979);

(2) la composition ionique des substrats réalistes industriels pouvant varier sensiblement d'une fermentation à l'autre, il apparaissait pertinent d'évaluer la stabilité du métabolisme de notre levure en fonction de variations qualitatives et quantitatives dans la composition ionique du bouillon de fermentation.

Préparation des divers milieux de culture

Le milieu de base utilisé pour cette expérience fut le bouillon Hajny régulier (glucose à 20%, extrait de levure à 1,0%, urée à 0,1%), supplémenté ou non par diverses quantités de chacun des sels minéraux sélectionnés. Les sels minéraux choisis furent: NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgSO_4$ et KH_2PO_4. Chacun des sels fut testé à quatre concentrations différentes: 0,01 M, 0,04 M, 0,1 M et 0,2 M. Deux observations majeures furent faites durant la préparation des bouillons de culture:

(1) un précipité important apparu suite à la stérilisation (autoclave) de tous les bouillons contenant du chlorure de

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

calcium ($CaCl_2$); il fut alors décidé d'abandonner cette partie de l'expérience;

(2) chacun des sels affecta le pH des milieux de culture (avant et après stérilisation) à sa façon (voir Tableau VII) (pour consultation).

Inoculation et conditions d'incubation

Quelques précisions doivent être apportées quant à l'inoculation, aux conditions d'incubation, et à la procédure d'échantillonnage:

(1) inoculum (72 h) préparé dans bouillon Hajny (glucose 20%);

(2) cinq fioles (25 mL de bouillon dans fioles Erlenmeyer de 250 mL: bouchon-éponge) inoculées (1,0 mL d'inoculum) pour chaque milieu (17 milieux évalués);

(3) suite à l'inoculation, une des cinq fioles inoculées fut placée à 5°C (temps 0) en attendant l'échantillonnage;

(4) incubation: 35°C, 250 rpm (incubateurs modèle G-25; New Brunswick Sci.);

(5) échantillonnage: le contenu complet d'une fiole fut versé dans un cylindre gradué de 25 mL, la fiole rincée à l'eau distillée et l'eau de rinçage ajoutée au cylindre.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

TABLEAU VII

Influence de certains sels minéraux sur le pH
des milieux de culture avant et après stérilisation

SEL	STERILISATION(2)	CONCENTRATION DU SEL:				
		0	0,01	0,04	0,10	0,2 M
		pH(23°C)				
$CaCl_2$ (1)	- avant	6,09	6,04	5,92	5,77	5,63
	- après	6,12	précipité à rejeter			
$MgSO_4$ (1)	- avant	6,09	6,13	6,02	5,88	5,80
	- après	6,12	6,14	6,16	6,16	6,14
NaCl	- avant	6,09	6,23	6,18	6,15	6,11
	- après	6,12	6,03	6,18	6,17	6,15
KCl	- avant	6,09	6,20	6,20	6,20	6,19
	- après	6,12	6,17	6,24	6,27	6,28
KH_2PO_4	- avant	6,09	5,74	5,43	5,21	4,95
	- après	6,12	5,87	5,51	5,25	5,11

(1) $CaCl_2$ sous forme de $CaCl_2.2H_2O$; $MgSO_4$ sous forme de $MgSO_4.7H_2O$.

(2) Stérilisation: autoclave, 121°C - 10 minutes

CRIQ

Volume complété à 25 mL. Après resuspension du contenu, un échantillon (1,5 mL) fut pris, centrifugé, et congelé tel que décrit dans la section METHODES. Cette nouvelle méthode d'échantillonnage nous permettait d'annuler l'imprécision dans la mesure des produits due à l'évaporation.

Les échantillons furent analysés par chromatographie sur couche mince et par chromatographie liquide sous haute pression selon les méthodes habituelles.

Influence du sulfate de magnésium ($MgSO_4$)

Plusieurs observations intéressantes furent faites quant à l'influence du sulfate de magnésium sur la fermentation du glucose par S. bisporus var. mellis:

(1) le sulfate de magnésium influença peu ou pas le taux final de consommation du glucose (Figure 7);

(2) la production d'éthanol fut grandement favorisée par l'ajout de ce sel;

(3) finalement, la présence de sulfate de magnésium fut nuisible à la production de glycérol et du mélange D-arabitol + D-mannitol.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

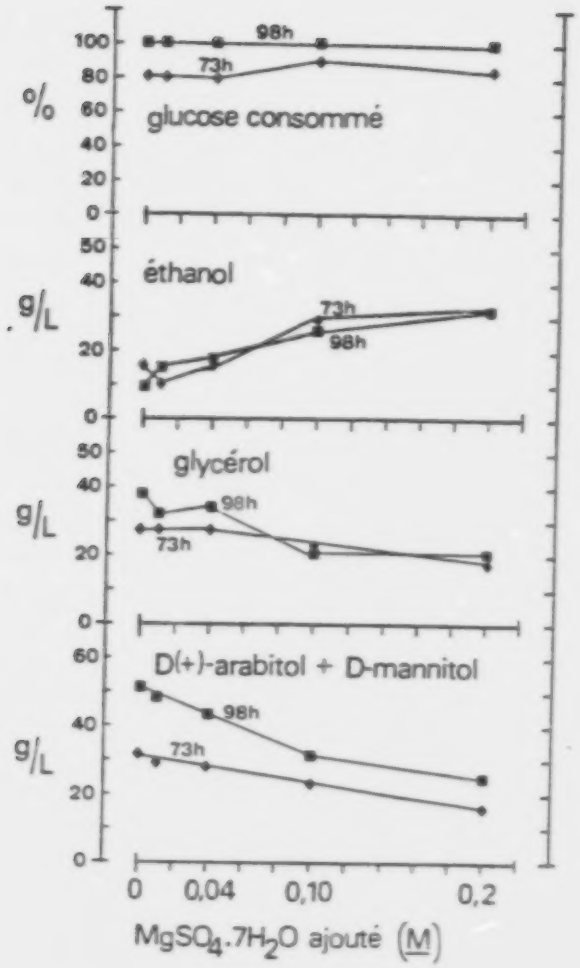


FIGURE 7: Influence du sulfate de magnésium sur la fermentation du glucose (20%) par S. bisporus var. mellis ATCC 12572. Résultats à 73 et 98 h.

Conditions d'incubation: 35°C, 250 rpm
Milieu de culture: glucose à 20%, extrait de levure à 1%, urée à 0,1%.

CRIQ

Influence du chlorure de sodium (NaCl)

Avec S. bisporus var. mellis, la présence de chlorure de sodium fut nuisible ou sans effet en tout: consommation du glucose, production d'éthanol et des divers polyols (Figure 8). Les résultats laissent soupçonner que de faibles concentrations en chlorure de sodium (0,01 à 0,04 M) pourraient être très légèrement favorables à la production du mélange D-arabitol + D-mannitol.

Influence du chlorure de potassium (KCl)

(1) le chlorure de potassium montra peu d'effet sur la consommation du glucose (Figure 9);

(2) les résultats à 97 h indiquent que le chlorure de potassium fut sensiblement nuisible à la production de l'éthanol, du glycérol et du mélange D-arabitol + D-mannitol.

Influence du phosphate de potassium (KH_2PO_4)

Ici, seuls les résultats à 98 h seront discutés:

(1) le phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4) ne démontra aucun effet sur la consommation du glucose mais fut favorable à la production d'éthanol (Figure 10);

(2) ce sel, toutefois, fut très défavorable à la production du glycérol et du mélange D-arabitol + D-mannitol.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

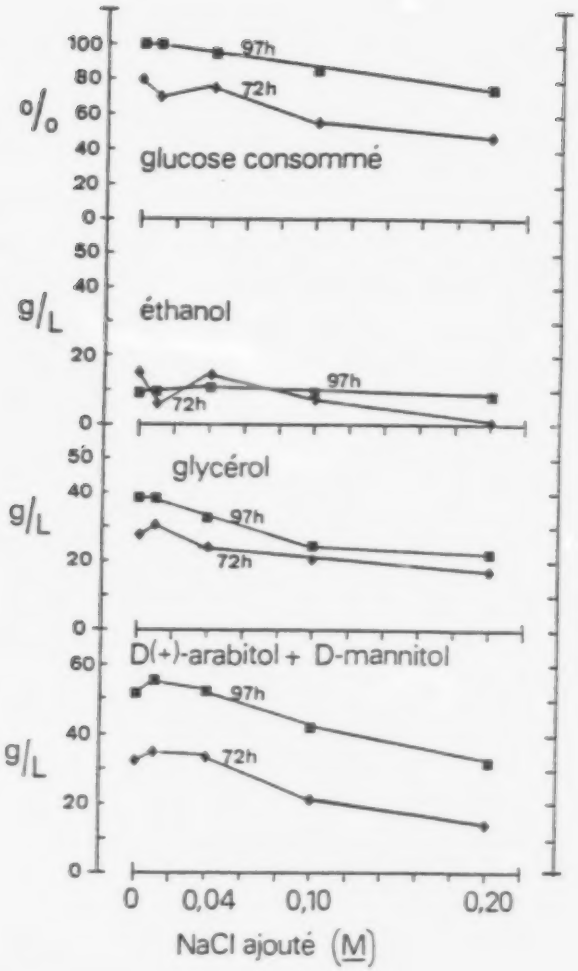


FIGURE 8: Influence du chlorure de sodium sur la fermentation du glucose (20%) par S. bisporus var. mellis ATCC 12572. Résultats à 72 et 97 h. Conditions d'incubation et milieu de culture comme à la Figure 7.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Conclusion préliminaire

Considérant le peu d'effets bénéfiques obtenus par l'addition de l'un ou l'autre des quatre sels minéraux testés, il fut conclu d'omettre ces sels dans les fermentations subséquentes. L'ajout de sels augmenterait aussi le coût du milieu de culture.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

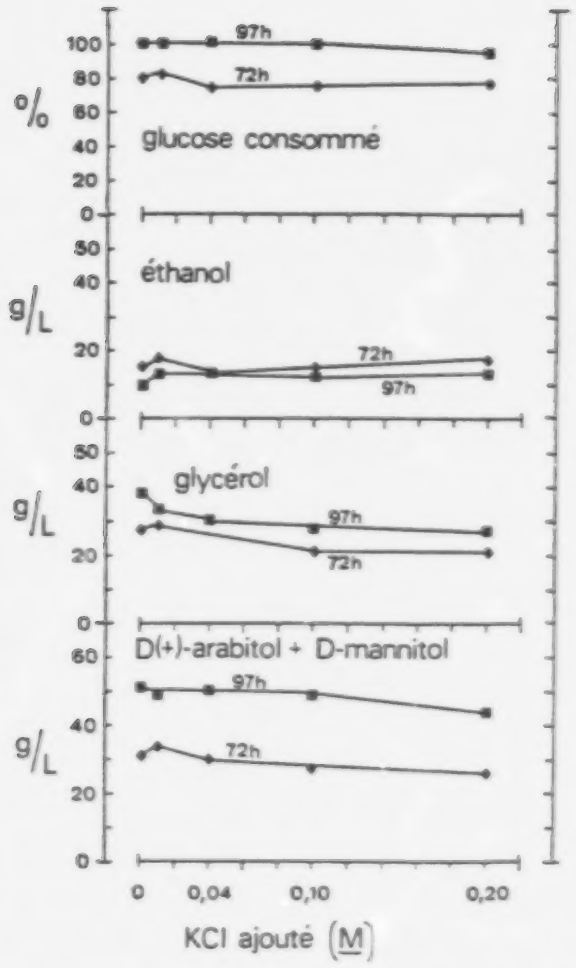


FIGURE 9: Influence du chlorure de potassium sur la fermentation du glucose (20%) par S. bisporus var. mellis ATCC 12572. Résultats à 72 h et 97 h. Conditions d'incubation et milieu de culture comme à la Figure 7.

CRIQ

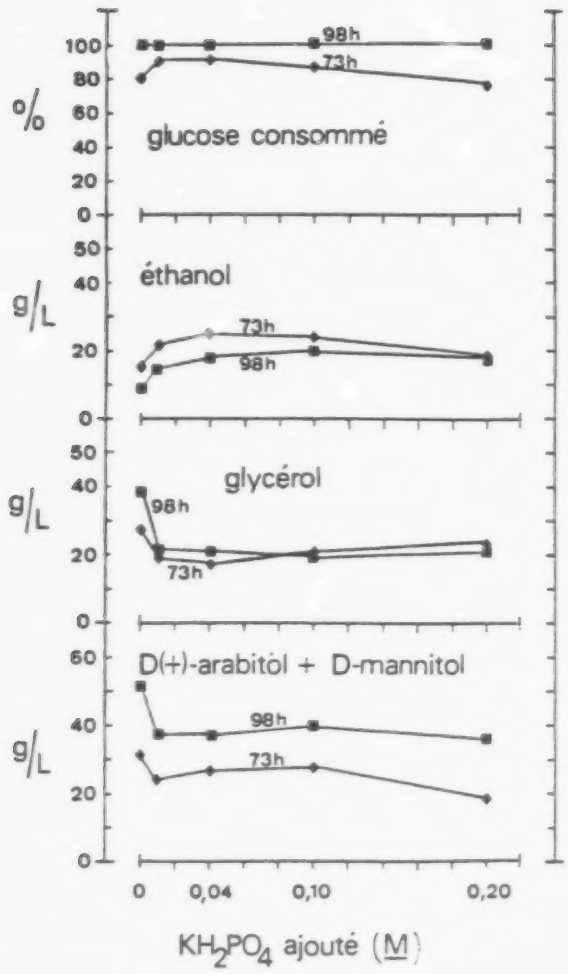


FIGURE 10: Influence du phosphate de potassium monobasique sur la fermentation du glucose (20%) par S. bisporus var. mellis ATCC 12572. Résultats à 73 et 98 h. Conditions d'incubation et milieu de culture comme à la Figure 7.

CRIQ

Influence de l'agitation et de l'aération

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Suite à l'examen de l'influence de l'extrait de levure et de certains sels minéraux sur notre fermentation, les expériences à très petite échelle (en fioles) furent arrêtées; nous avons alors jugé qu'il était temps de passer aux expériences en petits fermenteurs. Nous avons ainsi évalué l'effet de l'agitation et celui de l'agitation + aération sur le métabolisme de S. bisporus var. mellis ATCC 12572.

Influence de l'agitation

Nous avons voulu d'abord vérifier l'influence de différents niveaux d'agitation (sans ajout forcé d'air) sur notre fermentation. Seul l'air fourni par l'agitation et le contact avec l'air ambiant était alors disponible pour les cellules. Cette expérience était intéressante du point de vue industriel car elle nous permettait de savoir si oui ou non une fermentation efficace pouvait être obtenue en utilisant uniquement l'agitation comme méthode d'aération. L'aération conventionnelle (ajout forcé d'air par compresseur) est une méthode énergivore et dispendieuse.

Cette expérience fut conduite comme suit:

(1) quatre petits fermenteurs de 2 L (volume utile: 1500 - 1600 mL) furent utilisés (modèle Multigen F-2000, New Brunswick Sci.);

(2) le pH ne fut pas contrôlé mais mesuré de façon intermittente;

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

(3) les niveaux d'agitation évalués furent: 79, 200, 400 et 500 rpm (niveaux d'agitation calibrés en utilisant un tachymètre Digistrobe);

(4) autres conditions:
- milieu Hajny (glucose à 20%, extrait de levure à 1,0%, urée à 0,1%);
- T° = 35°C;
- quantité d'inoculum: 120 mL (pour un volume total de 1570 mL).

Les résultats de cette expérience sont présentés à la Figure 11 et au Tableau VIII. Les observations suivantes furent faites:

(1) un niveau d'agitation de 79 rpm n'était pas suffisant pour maintenir la fermentation homogène: une fraction des cellules se retrouva sous forme de sédiment dans ces conditions;

(2) les courbes de pH furent quasi-identiques dans les quatre fermentations: le pH était environ 5,75 - 5,90 juste après l'inoculation, descendit jusqu'aux environs de 4,60 - 4,85 (vers 48 h) et remonta alors très légèrement d'environ 0,2 unité;

(3) dans tous les cas, les conditions employées causèrent très peu d'évaporation (moins de 4%, v/v);

(4) l'utilisation du glucose fut faible à tous les niveaux d'agitation évalués mais proportionnelle au niveau d'agitation (Figure 11). Même avec une agitation de 500 rpm,

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

seulement 37,1% du glucose avait été consommé après 108 h. Ces résultats démontrèrent clairement que les quantités d'air fournies par les différents niveaux d'agitation n'étaient pas suffisantes pour permettre une fermentation efficace du glucose;

(5) les pauvres conditions d'aération ainsi obtenues favorisèrent cependant la production de l'éthanol au détriment de celle des polyols (glycérol, D-arabitol + D-mannitol). En général, la production d'éthanol fut proportionnelle au niveau d'agitation (Figure 11). Les rendements en éthanol (g/g) varièrent de 0,30 à 0,37, ce qui constitue 59 à 72% du rendement théorique (Tableau VIII) (rendement théorique: 0,51);

(6) la production de glycérol fut faible dans tous les cas (Figure 11), étant 6 à 8 fois inférieures à celles obtenues précédemment (par exemple, consulter les Figures 7 et 8). Il est certain qu'une bonne partie de cette baisse fut causée par la faible consommation du glucose. Les rendements en glycérol varièrent de 0,088 à 0,12 (g/g) (Tableau VIII);

(7) comme avec le glycérol, la production du mélange D-arabitol + D-mannitol fut faible à tous les niveaux d'agitation testés. Cette production fut aussi 6 à 8 fois inférieures à celles obtenues précédemment (voir Figures 7 et 8); la faible consommation du glucose en est aussi la cause principale. Les rendements varièrent de 0,11 à 0,14 (g/g).

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Influence de l'agitation + aération

Les derniers résultats indiquant que l'agitation seule ne donnait pas de fermentations efficaces, il nous fallait alors évaluer l'influence de différents niveaux d'aération (ajout d'air forcé) sur la fermentation. Les conditions de base pour cette expérience furent identiques à celles décrites précédemment (mêmes fermenteurs, même milieu et volume, même inoculum, etc.) sauf que:

(1) l'agitation fut fixé à 300 rpm;

(2) trois niveaux d'aération furent évalués: 0,33, 0,66 et 1,0 VVM (calculé sur la base d'un volume total de liquide de 1500 mL).

Comme d'habitude, le pH de chaque fermentation fut mesuré mais ne fut pas contrôlé. Les résultats de cette expérience sont présentés au Tableau IX et à la Figure 12. Les points suivants furent démontrés:

(1) en général, plus le niveau d'aération était élevé, plus le milieu de fermentation devint acide (Tableau IX): les différences n'étaient toutefois pas très grandes;

(2) l'évaporation fut proportionnelle au niveau d'aération et atteignit 28,9% pour une aération de 1,0 VVM; les calculs tiennent compte des volumes perdus lors de l'échantillonnage;

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

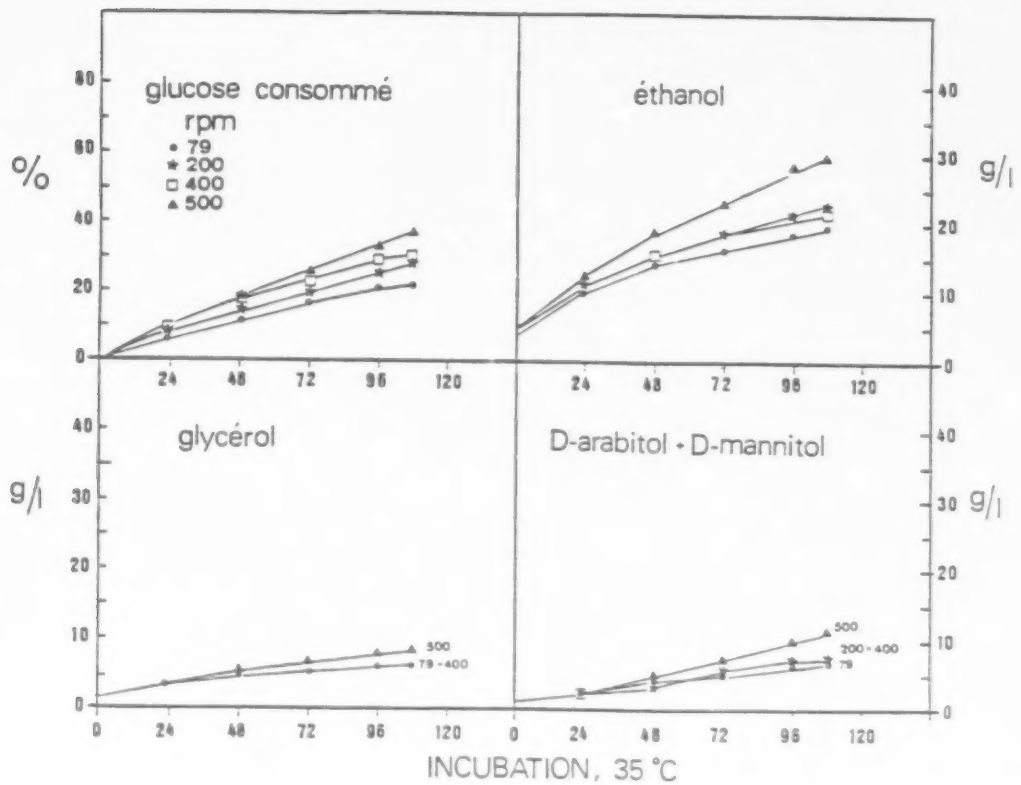


FIGURE 11: Influence de l'agitation (sans ajout forcé d'air) sur la fermentation du glucose par S. bisporus var. mellis ATCC 12572.

Milieu: Hajny (20% glucose, 1,0% extrait de levure, 0,1% urée)

T°: 35°C

Fermenteurs: Multigen F-2000 (New-Brunswick Sci.)

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

TABLEAU VIII

Influence de l'agitation: rendements en éthanol et polyols sur la base du glucose consommé

AGITATION (rpm)	GLUCOSE CONSOMME à 108 h (g/L)	Rendements (g/g)(1) à 108 h en: ETHANOL	GLYCEROL	D-ARABITOL + D-MANNITOL
79	41,2	0,37	0,12	0,13
200	53,7	0,34	0,094	0,11
400	56,3	0,30	0,088	0,11
500	70,7	0,35	0,10	0,14

(1) rendements calculés à partir des résultats rapportés à la Figure 11.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUEBEC

(3) la consommation du glucose, en terme de rapidité et de degré, fut sensiblement favorisée par l'augmentation de l'aération de 0,33 à 0,66 (ou 1,0)VVM (Figure 12). Les résultats semblaient même indiquer que 0,66 VVM était supérieur à 1,0 VVM;

(4) la production d'éthanol fut sensiblement favorisée par un accroissement de l'aération de 0,33 à 0,66 VVM jusqu'à environ 60 h; une aération de 1,0 VVM fut cependant défavorable. Il était une fois de plus très évident que le degré de consommation de l'éthanol était une fonction directe du niveau d'aération;

(5) finalement, les résultats indiquèrent que la production du glycérol et du mélange D-arabitol + D-mannitol était appréciablement favorisée par l'aération. Toutefois, cet effet bénéfique apparent de l'aération doit être tempéré par l'influence de l'évaporation sur ces résultats. Même en tenant compte de l'évaporation, l'influence de l'aération demeure toujours appréciable.

Conclusion préliminaire

L'agitation seule ne suffit pas à produire des fermentations rapides et efficaces; une aération forcée doit être fournie. L'influence de l'aération devrait être évaluée plus profondément en utilisant des fermenteurs permettant un transfert plus efficient de l'oxygène.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

TABLEAU IX

Influence de différents niveaux d'aération sur la fermentation. Evolution du pH et mesure du degré d'évaporation

TEMPS (h)	Niveau d'aération (VVM):		
	0,33	0,66	1,0
0	-	-	-
12	4,95	4,96	4,92
17,5	4,64	4,60	4,58
21,5	4,49	4,48	4,41
35	4,30	4,25	4,18
42	4,35	4,25	4,15
47	4,38	4,25	4,13
58,5	4,42	4,22	4,07
74	4,45	4,23	3,96
86,5	4,41	4,32	4,00
95	4,33	4,38	4,02
107	4,34	4,39	4,01
% d'évaporation (environ)	13 %	23,4 %	28,9 %

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

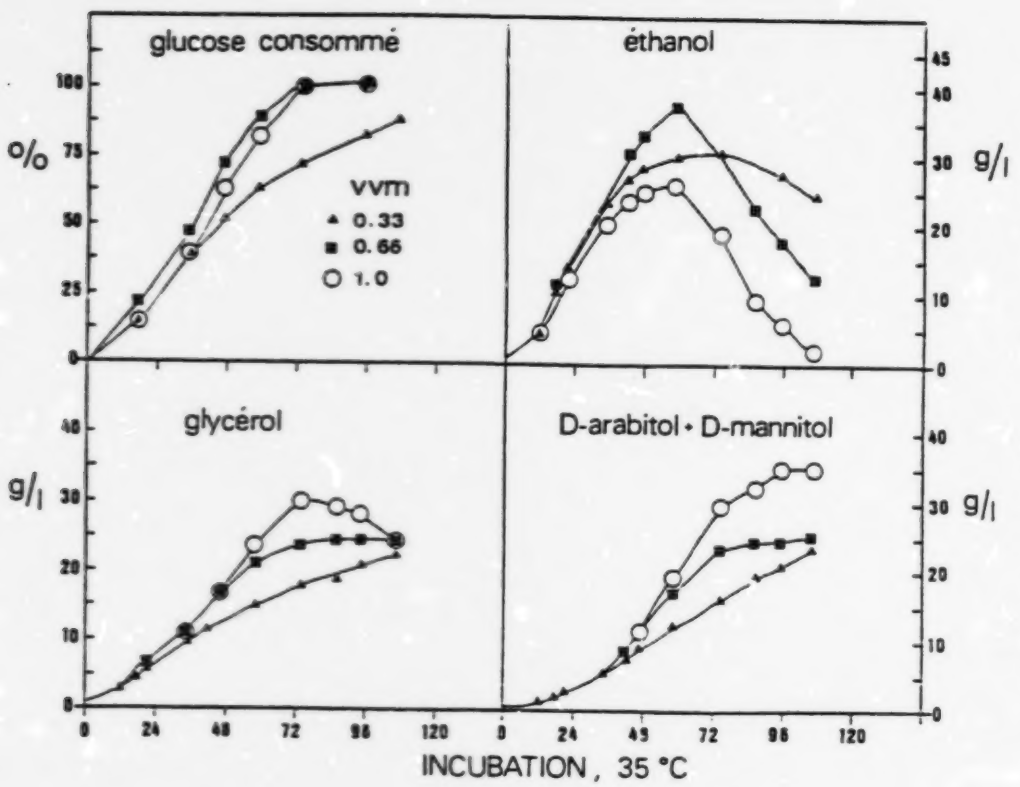


FIGURE 12: Influence de l'agitation + aération sur la fermentation du glucose par S. bisporus var. mellis ATCC 12572.

Conditions: voir Figure 11

CRIQ

Fermentation à plus grande échelle (16 L)

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Comme dernière expérience, nous avons voulu évaluer la performance de S. bisporus var. mellis ATCC 12572 en fermenteur de plus grande capacité (volume utile: environ 16 litres). Cette expérience n'était pas prévue dans notre proposition de recherche originale. Cette fermentation fut faite comme suit:

(1) utilisation d'un fermenteur Chemap (modèle CF-11) de 20 L (volume théorique);

(2) milieu de culture habituel (20% glucose, 1% d'extrait de levure, 0,1% d'urée);

(3) mesure continuelle du pH, du potentiel redox (lecture relative, sans correction), et de la concentration d'oxygène et de gaz carbonique (CO_2) dissouts. Le pH ne fut pas contrôlé;

(4) l'aération fut fixé à 1,0 VVM;

(5) inoculum: 8% (v/v): autres conditions: 35°C, 400 rpm;

(6) contrôle mécanique (briseur de mousse Chemap modèle Fundafoam) et chimique (antimousse stérile "Antifoam Emulsion A", Sigma no A-5758) de la mousse produite durant la fermentation (contrôle mécanique et chimique intermittent).

On trouvera à la Figure 13 les résultats de cette expérience. Plusieurs observations intéressantes furent faites:

(1) la fermentation fut relativement rapide (moins de 100 h);

CRIQ

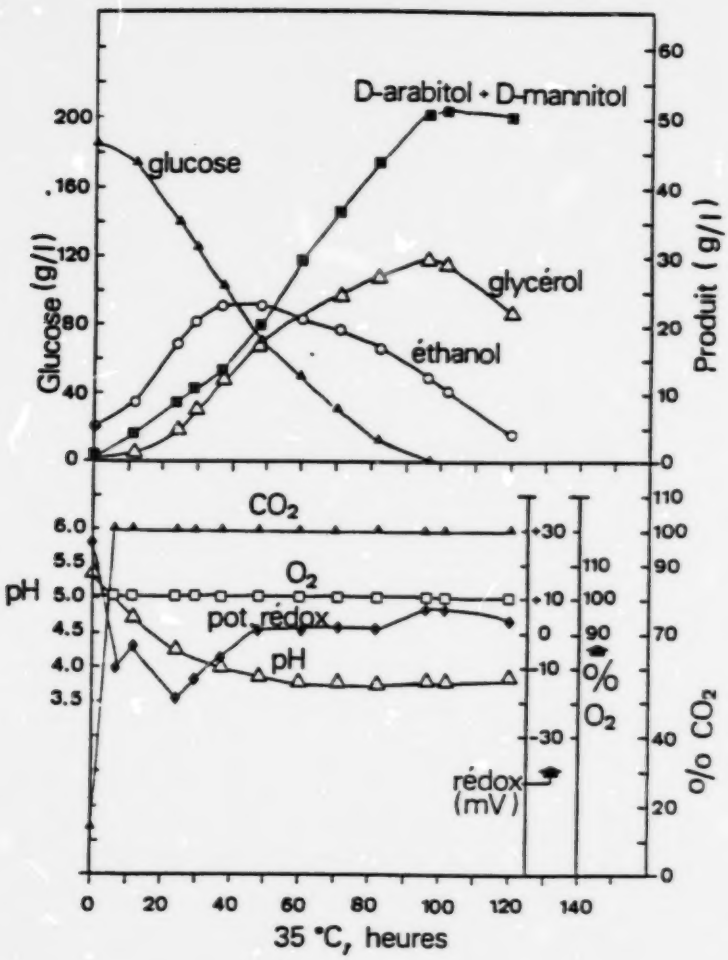


FIGURE 13: Fermentation du glucose à l'échelle 16 L par S. bisporus var. mellis ATCC 12572.

T° et agitation: 35°C, 400 rpm
Aération: 1,0 VVM
Milieu de culture: Hajny (20% glucose) habituel

CRIQ

(2) la consommation du glucose s'accompagna d'une baisse relativement rapide du pH (pH 5,35 à 0 h et pH 3,77 à 71 h); le pH se stabilisa autour de 3,80 pour le reste de la fermentation;

(3) l'aération (1,0 VVM) sembla adéquate puisque la concentration d'oxygène dissout fut continuellement maintenue à 100%;

(4) la concentration du CO_2 dissout était de 13,9% de la valeur de saturation à 0 h et augmenta très rapidement pour atteindre 100,3% de la valeur de saturation à 6 h et se maintenir à cette valeur jusqu'à la fin de la fermentation;

(5) le potentiel redox (lecture relative, sans correction) était + 26 mV à 0 h et baissa rapidement pour prendre une valeur négative (-10 mV) à 6 h et demeurer dans la zone négative jusqu'à 37 h (au moins). Le potentiel redox avait repris une valeur positive (1 mV) à 48 h et demeura positif jusqu'à la fin de la fermentation. Ces résultats indiquèrent que la fermentation fut sensiblement anaérobie entre 6 et 37 h, suggérant une activité métabolique très intense durant cette période;

(6) l'éthanol s'accumula dans le milieu pour atteindre une concentration de 23 g/L à 48 h; par la suite, la concentration d'éthanol baissa régulièrement jusqu'à une concentration finale de 4,1 g/L à 120 h. Nous pensons que cette

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

baisse est attribuable à la consommation de l'éthanol par les levures une fois une bonne portion du glucose utilisée. Il est intéressant de noter que l'accumulation de l'éthanol s'arrêta dès que le potentiel redox redevint positif (voir Figure 13, résultat à 48 h), suggérant que la production d'éthanol par cette levure requiert des conditions d'oxydo-réduction légèrement réductrices;

(7) le glycérol s'accumula régulièrement jusqu'à ce que tout le glucose soit consommé (96 h) pour atteindre une concentration finale de 29,5 g/L; par la suite, la concentration de glycérol descendit jusqu'à 22 g/L, baisse probablement causée par l'utilisation d'une partie du glycérol par les levures;

(8) finalement, la concentration du mélange D-arabitol + D-mannitol augmenta très régulièrement, tout comme celle du glycérol, pour donner une concentration finale de 51 g/L à 101,5 h, une fois que tout le glucose fut utilisé. Contrairement aux cas de l'éthanol et du glycérol, la concentration du mélange D-arabitol + D-mannitol demeura stable (ou presque) suivant la disparition complète du glucose.

Nous avons calculé les rendements en produits (g/g) à différents temps durant la fermentation (Tableau X). Le rendenent des divers produits fut comme suit:

(1) celui de l'éthanol baissa fortement avec le temps;

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

(2) celui du glycérol fut relativement stable;

(3) celui du mélange D-arabitol + D-mannitol augmenta considérablement avec le temps.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

TABLEAU X

Rendements (g/g) en produits à différents
temps durant la fermentation
(référence: Figure 13)

TEMPS (h)	GLUCOSE CONSOMME (g/L)	Rendement (g/g) en: ETHANOL	GLYCEROL	D-ARABITOL + D-MANNITOL
24	45,7	0,38	0,18	0,096
48	113,7	0,20	0,15	0,176
72	157	0,12	0,16	0,24
96	185	0,067	0,16	0,27

NOTE: Rendements calculés à partir du résultats de la Figure 13.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

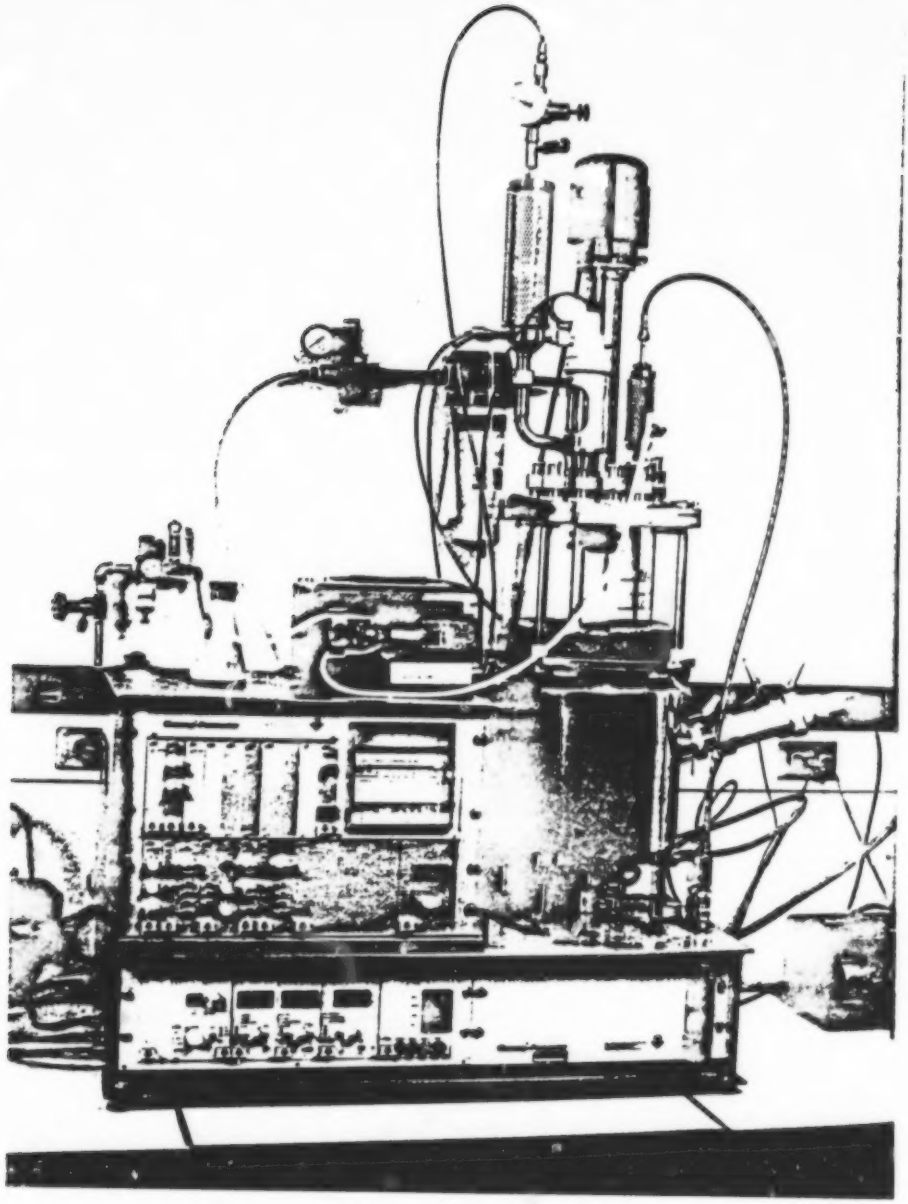


FIGURE 14: Fermenteur Chemap modèle CF-11 (capacité 20 L) utilisé pour la fermentation à plus grande échelle

Contrôle mécanique et chimique de la mousse (contrôle intermittent).

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

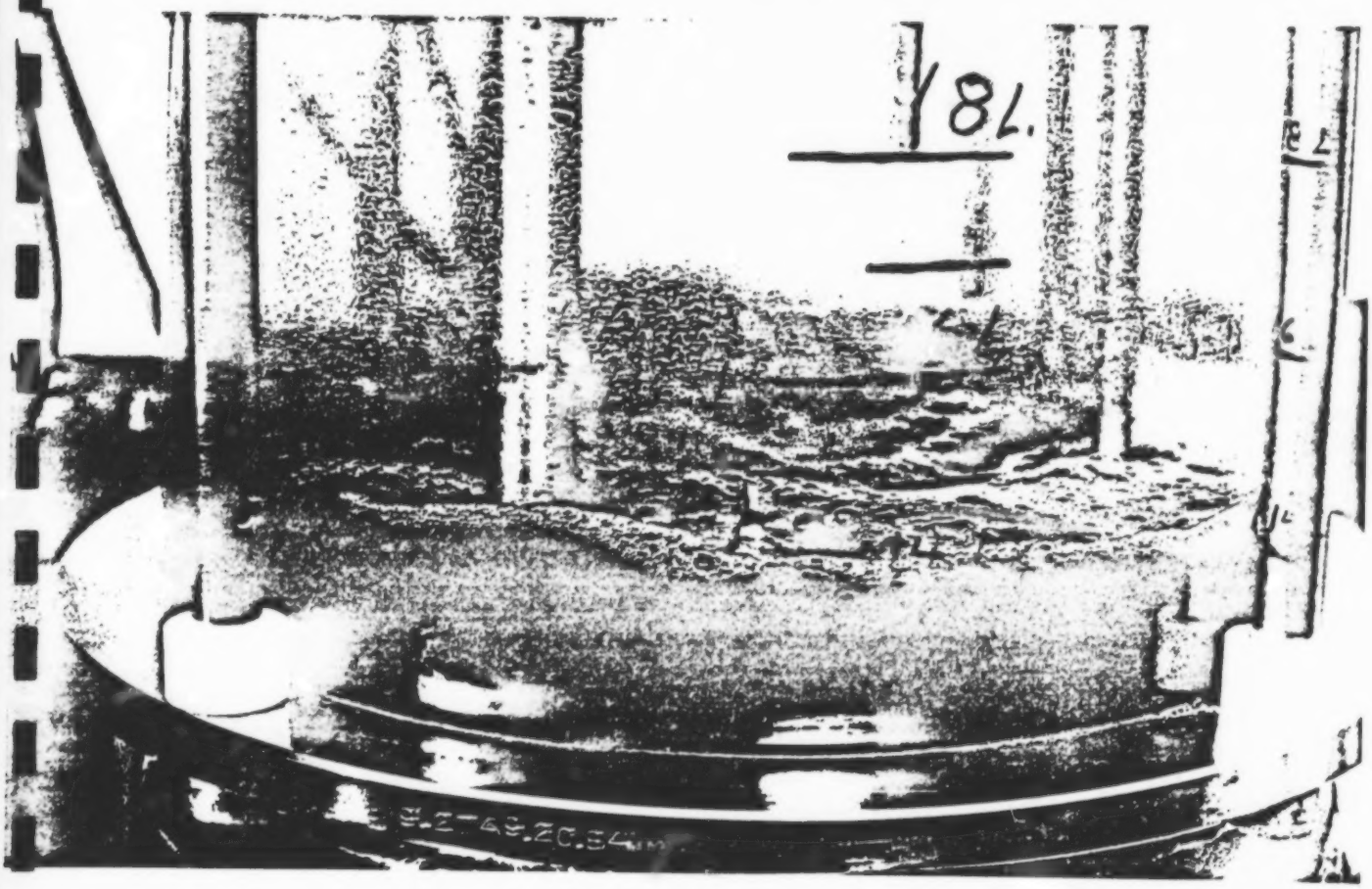


FIGURE 15: Apparence de la fermentation vers 100 h.

Référence: Figure 14

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

DISCUSSION

CONCLUSIONS

RECOMMANDATIONS

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

DISCUSSION

L'objectif principal de cette partie du projet était de démontrer la faisabilité, à petite échelle, d'un procédé de production d'éthanol et de polyols (mélange) par fermentation avec des levures osmophiles. Cette fermentation, une fois optimisée et appliquée industriellement, pourrait suppléer une partie de nos besoins énergétiques en carburant liquide (éthanol) et en matières premières (polyols) pour l'industrie chimique. Rappelons une fois de plus que ce procédé de fermentation intéresse présentement certains industriels au Japon, aux Etats-Unis et en Inde.

Nos travaux ont conduit à plusieurs observations et résultats intéressants dont nous allons maintenant discuter en plus de détails. Pour fins de simplicité, cette discussion sera faite par thème.

Criblage des levures osmophiles

En tout, trente-six levures osmophiles furent examinées quant à leur potentiel pour la production d'éthanol et de polyols. Deux étapes de criblage permirent de pré-sélectionner quatre levures osmophiles prometteuses. Celles-ci étaient: *Torulopsis mangoliae* ATCC 13782, *Pichia farinosa* (*P. miso*) ATCC 20210, *Saccharomyces bisporus* var. *mellis* ATCC 12572 et *S. bisporus* ATCC 22694. Comme il nous était très difficile d'effectuer une sélection finale parmi les quatre levures osmophiles présélectionnées, il fut alors décidé de continuer les travaux

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

avec les quatre levures et de ne faire le choix final de la levure osmophile que suite à l'expérience portant sur l'influence de l'extrait de levure. La levure S. bisporus var. mellis ATCC 12572 fut finalement choisie; les critères ayant servi à cette sélection sont bien décrits dans le Tableau VI. La sélection finale fut somme toute assez facile.

Les divers travaux de criblage nous ont permis de faire plusieurs observations intéressantes:

(1) la capacité des levures osmophiles testées à fermenter efficacement le sucrose (saccharose) est assez peu répandue (3 souches sur 13): les souches positives furent Torulopsis candida ATCC 36584, Kluyveromyces thermotolerans ATCC 20309 et Torulopsis magnoliae ATCC 13782;

(2) la souche Torulopsis magnoliae NCYC-764 sembla produire un peu de sorbitol (6,8 g/L);

(3) plusieurs levures osmophiles produisirent des quantités appréciables du polyol i-érythritol (Tableau IV). Ce résultat nous semble très intéressant en vue du fait que l'i-érythritol possède 80% du pouvoir sucrant du sucrose mais n'est à peu près pas métabolisé par le corps humain (Bioprocessing Technology, mai 1986). Ce polyol pourrait donc devenir un édulcorant non-calorifique naturel très en demande.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Production d'éthanol

Potentiel

Dépendamment des conditions employées, presque toutes les levures osmophiles examinées peuvent produire de l'éthanol (voir Tableaux IV et VIII et Figures 2 à 5). La quantité d'éthanol produite varia grandement parmi les levures osmophiles et avec les conditions utilisées. Dans tous les cas, les quantités d'éthanol produites, bien qu'appréciables dans plusieurs cas, furent toujours très inférieures aux quantités qui auraient été produites, dans les mêmes conditions, par la levure non-osmophile Saccharomyces cerevisiae. Deux points sont apparus très clairs:

(1) les levures osmophiles n'ont probablement pas d'avenir dans un contexte où seul l'éthanol serait le produit recherché;

(2) l'éthanol doit être vu comme un produit secondaire (mais important!) des levures osmophiles, les principaux produits étant les polyols. Ainsi, les liqueurs de fermentations obtenues après action des levures osmophiles contiendront presque toujours des quantités appréciables d'éthanol que l'on pourra récupérer, purifier, et vendre, ce qui devrait aider à rentabiliser le procédé de fermentation.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

La production d'éthanol par les levures osmophiles pourraient sans doute être grandement améliorée soit en optimisant les conditions de fermentation soit en minimisant les pertes d'éthanol dues à sa consommation par les levures. Cependant, considérant que l'éthanol peut être facilement produit par la levure non-osmophile S. cerevisiae, on peut se demander si de tels travaux en valent vraiment la peine.

Production de glycérol

Potentiel

Certaines levures osmophiles offrent un potentiel très attrayant pour la production industrielle de glycérol par fermentation. Ce glycérol pourrait un jour remplacer le glycérol présentement dérivé du pétrole, une ressource non-renouvelable. Voici quelques raisons qui nous motivent à penser ainsi:

(1) des quantités de glycérol de l'ordre de 40 g/L ont été facilement obtenues avec S. bisporus var. mellis ATCC 12572 (Figures 4 et 7);

(2) la production de glycérol par les levures osmophiles ne requiert pas nécessairement l'ajout de sulfite ou de substances alcalines comme c'était le cas avec les vieux procédés de production du glycérol par fermentation employés pendant un certain temps en Europe et aux Etats-Unis et utilisant des levures non-osmophiles du genre Saccharomyces (Prescott et Dunn, 1959; Lilly, 1935; Eoff et coll., 1919; Freeman et Donald, 1957);

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

(3) il semble que des concentrations en glycérol de l'ordre de 110 à 130 g/L peuvent être obtenues avec certaines levures osmophiles en modifiant les conditions de fermentation (Vijaikishore et Karanth, 1984), ce qui rend de telles fermentations très intéressantes du point de vue industriel;

(4) la production de glycérol par S. bisporus var. mellis ATCC 12572 (notre levure) pourrait certes être grandement améliorée de plusieurs façons (optimisation des conditions physico-chimiques, utilisation de souches mutantes plus performantes, optimisation du procédé par des travaux de nature génie biochimique, etc.).

Production de D-arabitol et/ou de D-mannitol

Potentiel

Il est malheureux que notre méthode d'analyse quantitative ne puisse pas séparer le D-arabitol et le D-mannitol et nous oblige à rapporter les résultats, pour l'instant, comme un mélange de ces deux substances. Les résultats de nombreuses analyses par chromatographie sur couche mince de cellulose suggèrent qu'il s'agirait uniquement de D-arabitol. Nous considérons, cependant, qu'il s'agit là d'une identification préliminaire et qu'il est préférable d'attendre le résultat des travaux plus approfondis (récupération et purification du polyol, caractérisation chimique et physique, spectrométrie de masse, etc.) avant de nous prononcer plus absolument sur la nature de ce

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

polyol. Nous continuerons donc à rapporter les résultats comme un mélange de D-arabitol et de D-mannitol.

La production de ce mélange de polyols par S. bisporus var. mellis ATCC 12572 fut souvent très importante; les observations suivantes en témoignent:

(1) des concentrations du mélange D-arabitol + D-mannitol de l'ordre de 50-52 g/L furent obtenues lors d'expériences à très petite échelle (fioles de 250 ml) (Figure 7);

(2) des concentrations de l'ordre de 35-36 g/L furent observées dans certaines fermentations faites en petits fermenteurs (2 L) en présence d'agitation et d'aération (Figure 12);

(3) des concentrations en D-arabitol + D-mannitol de l'ordre de 50-51 g/L furent aussi obtenues lors d'une fermentation à l'échelle 16 L (aussi en présence d'agitation et d'aération) (Figure 13);

Puisque les bouillons de fermentation initiaux contenaient 200 g/L de glucose, on peut calculer que le rendement (g/g) en D-arabitol + D-mannitol était environ 0,25, ce qui est très bon pour le cas d'une fermentation encore assez peu optimisée. Avec notre levure, le mélange D-arabitol + D-mannitol a toujours constitué une fraction très importante des produits de la fermentation. Saccharomyces bisporus var. mellis ATCC 12572 semble donc un microorganisme de choix pour la production de D-arabitol et/ou de D-mannitol.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Influence de l'extrait de levure

Des expériences conduites avec quatre levures osmophiles ont clairement démontré qu'une concentration en extrait de levure de l'ordre de 1,0% (P/V) était généralement requise pour une fermentation efficace du glucose et une bonne production d'éthanol (Figures 2 à 5). L'influence de l'extrait de levure sur la production des polyols, quant à elle, varia avec les levures osmophiles. Ces résultats peuvent être discutés en ces termes;

(1) il est difficile de comprendre pourquoi autant d'extrait de levure (1,0% P/V) est nécessaire afin d'obtenir une fermentation efficace du glucose. Nous voyons au moins deux raisons à cet état de fait:

- les conditions de fermentation favorisaient peut-être trop la croissance des levures au détriment de la conversion du glucose en produits, de telle sorte que la demande en azote et en phosphore augmentait et ne pouvait être satisfaite que par une plus grande provision d'extrait de levure (source d'azote et de phosphore);

- ou encore, l'extrait de levure fournissait peut-être un ou plusieurs éléments nutritifs inconnus absolument nécessaires pour permettre la fermentation efficace de concentrations élevées en glucose (20%, P/V). Ces éléments nutritifs seraient présents en faible concentration dans l'extrait de levure et il faudrait alors

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

utiliser une concentration d'extrait de levure assez élevée afin de satisfaire les besoins de la levure;

(2) l'effet généralement bénéfique de l'extrait de levure sur la production de l'éthanol peut probablement être expliqué en partie par le fait que l'extrait de levure rend habituellement les milieux de culture plus anaérobies, conditions qui favorisent la production (ou l'accumulation) de l'éthanol (Onishi, 1961; Spencer, 1968; Onishi et Saito, 1961; Hajny et coll., 1960). Tel que rapporté par Onishi et Saito (1961), il est possible de produire de l'éthanol dans une fermentation en apparence aérobie lorsque la concentration de l'extrait de levure est élevée. Une partie de l'amélioration dans la production de l'éthanol était aussi probablement due à une meilleure consommation du glucose obtenue en présence de concentrations élevées en extrait de levure;

(3) tel que rapporté un peu plus tôt, l'influence de l'extrait de levure sur la production des divers polyols varia avec les levures osmophiles. L'extrait de levure fut généralement favorable à la production du glycérol par S. bisporus var. mellis ATCC 12572 mais défavorable dans le cas de Pichia farinosa ATCC 20210 et S. bisporus ATCC 22694 (Figures 2 à 5). Des observations similaires furent aussi faites en ce qui concerne la production du mélange D-arabitol + D-mannitol: l'extrait de levure fut favorable avec les levures Torulopsis magnoliae ATCC 13782 et S. bisporus var. mellis ATCC 12572 mais défavorable avec la levure Pichia farinosa ATCC 20210. Nous devons mettre ces différences dans l'influence de l'extrait de levure sur le compte de différences dans le métabolisme cellulaire parmi les diverses levures osmophiles.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

L'extrait de levure est un ingrédient dispendieux. Le besoin relativement élevé en extrait de levure (environ 1,0%, P/V) des levures osmophiles accroît ainsi sensiblement les coûts de la fermentation. Ce problème pourrait devenir au moins partiellement résolu en utilisant l'une ou l'autre des deux stratégies suivantes:

(1) utilisation de matières industrielles beaucoup moins dispendieuses que l'extrait de levure mais pouvant donner le même effet bénéfique, telles peut-être la "corn-steep liquor" (Spencer, 1968), certains extraits de fèves de soja (Onishi et coll., 1961), le lactate d'ammonium (Vijaikishore et Karanth, 1986), ou un extrait de malt (Dooms et Verachtert, 1968);

(2) emploi de procédés de fermentation minimisant l'utilisation de l'extrait de levure; deux exemples de tels procédés sont les cellules immobilisées et la fermentation par alimentation programmée ("fel-batch culture"). Avec ces deux types de procédés, une fois la population microbienne bien établie, il peut n'être pas nécessaire de continuer à fournir beaucoup d'extrait de levure afin de poursuivre la fermentation continue ou semi-continue du substrat: les coûts en extrait de levure seraient ainsi appréciablement réduits. Cela reste toutefois à démontrer expérimentalement.

En ce qui nous concernait, nous avons décidé, à la suite de ces résultats, de continuer à employer une concentration assez

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

élevée en extrait de levure (1% (P/V) d'extrait de levure pour une concentration en glucose de 20%), du moins pendant un certain temps. Nous espérons pouvoir réduire les coûts de cette fermentation dans un avenir assez proche en profitant de l'une ou l'autre des deux stratégies décrites précédemment.

Influence de certains sels minéraux

Ici, une précision importante doit être apportée avant d'entrer dans les détails. Dans le passé, plusieurs chercheurs ont examiné l'influence de fortes concentrations en sel(s) (NaCl et/ou autres) sur le métabolisme des levures osmophiles: les concentrations de sel utilisées étaient de l'ordre de 1 à 3 M (Onishi, 1961, 1963; Spencer, 1968; Vijaikishore et Karanth, 1984; Ramachandran et Sulebele, 1979). Nous n'avons pas voulu faire de telles études car nous considérions que l'addition d'aussi grandes quantités de sel serait coûteuse et nuirait probablement à la récupération des produits de la fermentation: notre décision fut ainsi basée sur des critères strictement pratiques. Nous désirions cependant connaître l'influence de concentrations relativement faibles de certains sels minéraux sur le métabolisme de S. bisporus var. mellis ATCC 12572. Tel que rapporté plus tôt dans ce rapport, notre désir était motivé par les faits suivants:

(1) certains sels minéraux peuvent affecter grandement le métabolisme de certaines levures osmophiles (Spencer, 1968; Onishi, 1963; Hajny et coll., 1960; Vijaikishore et Karanth, 1984; Ramachandran et Sulebele, 1979);

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

(2) puisque la composition ionique des substrats réalistes industriels pourrait varier sensiblement d'une fermentation à l'autre, il semblait approprié d'évaluer la stabilité ou non de notre levure en fonction de variations qualitatives et quantitatives dans la composition ionique du bouillon de fermentation.

Chacun des quatre sels minéraux fut évalué à des concentrations variant de 0,01 à 0,2 M (Figures 7 à 10). Les résultats obtenus peuvent être résumés et discutés comme suit:

(1) globalement, l'ajout de l'un ou l'autre des quatre sels minéraux ne montra pas d'effet bénéfique très évident;

(2) l'ajout de chlorure de sodium produisit un effet nuisible appréciable sur le degré de consommation du glucose (Figure 8). Des résultats semblables furent aussi obtenus par Vijaikishore et Karanth (1984);

(3) le sulfate de magnésium et le phosphate de potassium monobasique furent en général bénéfiques à la production d'éthanol (Figures 7 et 10). Hajny et coll. (1960) ont fait aussi la même observation avec une autre levure osmophile. On peut se demander toutefois si ces résultats ont une véritable signification en termes pratiques;

(4) en général, l'ajout de l'un ou l'autre des quatre sels minéraux fut très nuisible à la production du glycérol et du mélange D-arabitol + D-mannitol (Figures 7 à 10). Ceci

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

rejoint les observations faites par Vijaikishore et Karanth (1984) et Hajny et coll. (1960) avec d'autres levures osmophiles mais est aussi en contradiction avec certains autres résultats (par exemple, Spencer, 1968; Onishi, 1963; Ramachandran et Sulebele, 1979). Nos résultats indiquent vraisemblablement que S. bisporus var. mellis ATCC 12572 est une levure osmophile plus tolérante envers le sucre qu'envers les sels.

Suite à ces résultats, nous avons conclu que l'ajout de l'un ou l'autre des quatre sels minéraux évalués n'était pas du tout nécessaire.

Influence de l'agitation et de l'aération

Nos résultats démontrent clairement (Figure 11 et Tableau VIII) que l'agitation seule (sans ajout forcé d'air) ne peut conduire à des fermentations efficaces: la fermentation du glucose est alors très lente. Ces conditions, cependant, favorisent la production de l'éthanol au détriment de celle des polyols en termes de rendement (g/g).

Les fermentations furent beaucoup plus efficaces lorsque l'ajout d'air forcé fut permis (tout en gardant une bonne agitation) (Figure 12). Avec agitation + aération, la consommation du glucose fut grandement améliorée, ce qui permit une bien meilleure production du glycérol et du mélange D-arabitol + D-mannitol mais n'améliora pas beaucoup celle de l'éthanol. En fait, on peut conclure aisément que l'aération défavorisa très appréciablement la production de l'éthanol lorsque les

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

rendements (g/g) sont établis. Plus l'aération était élevée, plus grande était la qualité d'éthanol consommée par les levures. Dans les fermentations assez fortement aérées, l'accumulation de l'éthanol est donc temporaire et il faudra ainsi bien choisir le temps de récupération afin de maximiser la récupération de l'éthanol.

Les résultats de la Figure 12 indiquent qu'un niveau d'aération de l'ordre de 0,66 à 1,0 VVM devrait être adéquat pour permettre une bonne conversion du glucose en un mélange d'éthanol et de polyols avec S. bisporus var. mellis ATCC 12572: cet énoncé tient compte d'un niveau d'agitation de 300 rpm.

La plupart des travaux passés ont aussi indiqué qu'un certain niveau d'aération était requis pour une conversion maximale du glucose en divers polyols et qu'un niveau d'aération trop élevé nuisait à la production d'éthanol (Peterson et coll., 1958; Spencer, 1968; Ramachandran et Sulebele, 1979; Vijaikishore et Karanth, 1986; Hajny et coll., 1960; Onishi et Saito, 1962). Il n'est pas surprenant d'apprendre que trop d'aération nuit à la production d'éthanol; il est toutefois un peu surprenant de constater qu'un certain niveau d'aération est nécessaire pour une bonne production de polyols, lesquels sont en fait des substances réduites.

Fermentation à plus grande échelle

Comme dernière expérience, nous avons voulu vérifier si oui ou non les résultats précédents, obtenus de travaux à petite

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

échelle, pouvaient être reproduits à plus grande échelle: nous avons donc effectué une fermentation à l'échelle 16 L afin de répondre à cette question. Les résultats furent très satisfaisants (Figure 13 et Tableau X) et indiquèrent que:

(1) la fermentation était assez rapide (environ 100 h);

(2) la production du mélange D-arabitol + D-mannitol était aussi bonne que celles obtenues précédemment;

(3) la production d'éthanol et de glycérol fut un peu inférieure aux précédentes.

Toutes choses considérées, cette première fermentation à l'échelle 16 L prouvra une fois de plus le potentiel industriel intéressant de S. bisporus var. mellis ATCC 12572.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

CONCLUSIONS

Suite à nos travaux, nous croyons toujours que la production intégrée d'éthanol et de divers polyols (glycérol, D-arabitol + D-mannitol) par fermentation avec la levure osmophile S. bisporus var. mellis ATCC 12572 représente un procédé industriel prometteur. Ici, quelques précisions doivent être apportées:

(1) cette fermentation ne devrait pas être développée dans l'unique but de produire de l'éthanol. Si tel était le cas, il vaudrait mieux alors employer les levures non-osmophiles conventionnelles du type Saccharomyces cerevisiae, lesquelles sont probablement plus efficaces que notre levure pour la production d'éthanol;

(2) l'éthanol doit être vu comme un produit secondaire mais toutefois important de notre fermentation. L'éthanol ainsi produit pourrait être récupéré, purifié et vendu: les revenus découlant de cette production d'éthanol aideraient sans doute à rentabiliser la production des polyols;

(3) la fermentation doit être probablement développée dans le but de produire principalement le glycérol et le mélange D-arabitol + D-mannitol. Ces polyols commandent généralement des prix plus élevés que celui de l'éthanol et leur utilisation dans de nombreuses applications industrielles pourraient remplacer celle de substances présentement dérivées du pétrole;

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

(4) la production de glycérol et du mélange D-arabitol + D-mannitol par S. bisporus var. mellis ATCC 12572 est industriellement très prometteuse. Avant même optimisation, des quantités en glycérol de 40 g/L et de 50-52 g/L du mélange D-arabitol + D-mannitol ont été facilement obtenues. Cette production pourra sans doute être grandement améliorée dans l'avenir;

(5) la levure S. bisporus var. mellis ATCC 12572 est très facile d'utilisation; la fermentation elle-même est facile de conduite et relativement rapide (100-120 h).

Notre procédé de fermentation semble donc très intéressant. Il est, de plus, versatile, en ce sens qu'il pourrait permettre d'ajuster la production des divers produits de la fermentation en fonction du marché (Figure 16). En modifiant sensiblement les conditions d'aération, il devrait être possible d'orienter majoritairement la production soit vers l'éthanol (voie 1) soit vers les polyols (voie 2). Ce procédé de fermentation mérite certes d'être étudié de manière plus approfondie.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

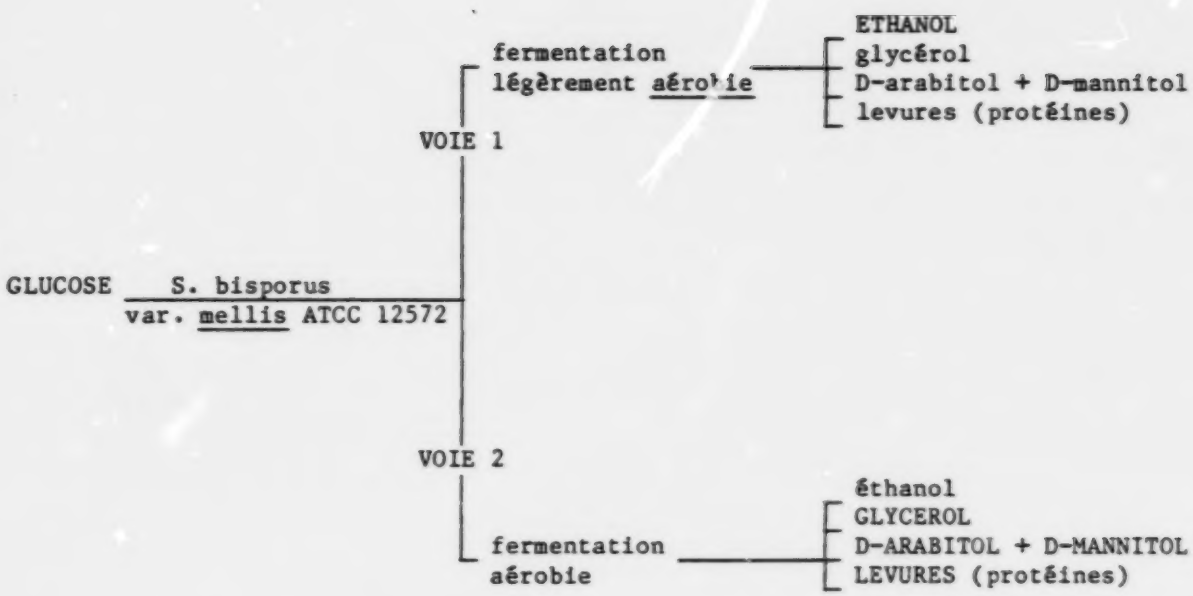


Figure 16: Versatilité (ou adaptabilité) de la fermentation du glucose par la levure osmophile S. bisporus var. mellis ATCC 12572

CRIQ

RECOMMANDATIONS

Jusqu'ici, nos travaux ont démontré clairement que la levure osmophile S. bisporus var. mellis ATCC 12572 offre un potentiel très intéressant pour la production industrielle d'éthanol, de glycérol, et de D-arabitol et/ou D-mannitol. Il reste toutefois un certain nombre d'étapes à franchir avant d'atteindre le niveau industriel. Nous croyons qu'il faut donner une chance raisonnable à ce procédé de fermentation de "s'exprimer" (ou de montrer tout son potentiel) avant d'émettre une conclusion définitive sur sa rentabilité industrielle. Dans ce contexte, nous recommandons d'entreprendre les travaux suivants:

(1) optimisation plus poussée des conditions d'aération. Nous pensons que certaines améliorations pourraient être apportées à ce chapitre. Par exemple, nous suggérons l'essai de cette fermentation dans un fermenteur de type "air-lift", lequel fermenteur est supposé permettre un meilleur transfert de l'oxygène;

(2) détermination de la nature des produits de la fermentation en fonction du pH. D'après nous, ces travaux sont parmi les plus importants. Il est possible que la production des polyols soit grandement avantagée par des conditions alcalines;

(3) conduite de fermentations suivant le mode d'alimentation programmée ("fed-batch") afin de connaître les concentrations maximales de chacun des produits pouvant être obtenues avec notre levure;

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

(4) essais de production en deux étapes, afin de découpler la production de biomasse de celle des produits: ceci pourrait permettre une meilleure conversion du substrat en produits;

(5) essais de fermentation avec des substrats réalistes (exemple: hydrolysats d'amidon, de blé, de pomme de terre, mélasses, etc.);

(6) puisque certaines levures osmophiles peuvent produire des quantités appréciables d'i-érythritol (Tableau IV), et que ce polyol semble posséder un potentiel intéressant comme édulcorant dans les aliments diététiques, nous pensons qu'il serait pertinent de contacter certaines industries alimentaires afin de connaître leur intérêt. La même chose peut être dite des levures osmophiles produisant du D-mannitol, un polyol aussi très intéressant et commandant un prix relativement élevé (Tableau I).

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

BIBLIOGRAPHIE

ADLER, L., A. Blomberg, et A. Nilsson, 1985
J. Bactériol., 162 (1): 300-306.

ANONYME, 1985. Biofutur, juillet-août, page 26.

ANONYME, 1986. Biotechnology, 4: 105 et Bioprocessing Technology, mai 1986, page 7.

BROWN, A.D., 1974. J. Bacteriol., 118 (3): 769-777.

DOOMS, L., et H. Verachtert, 1968. Revue des fermentations et des industries alimentaires, 23 (4): 135-142.

EDGLEY, M., et A.D. Brown, 1978. J. Gen. Microbiol., 104: 343-345.

EOFF, J.R., W.V. Linder, et G.F. Beyer, 1919. The J. Ind. Eng. Chem., 11 (9): 842-845.

FREEMAN, G.G., et G.M.S. Donald, 1957.
Appl. Microbiol., 5 (4): 197-210.

GRAHAM, J.C.J., 1961. British Patent no. 870,622.

HAJNY, G.J., J.H. Smith, et J.C. Garver, 1964. Appl. Microbiol., 12: 240-246.

HAJNY, G.J., W.F. Hendershot et W.H. Peterson, 1960. Appl. Microbiol., 8: 5-11.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

HAMADA, T., F. Noda, et K. Hayashi, 1984. Appl. Environ. Microbiol., 48 (4): 708-712.

LILLY, C.H., 1935. U.S. Patent no. 1,987,260.

MORAN, J.W., et L.D. Witter, 1979. J. of Bacteriol., 138 (3): 823-831.

NICKERSON, W.J., et R.G. Brown, 1965. Adv. Appl. Microbiol., 7: 225-272.

NOBRE, M.F. et M.S. da Costa, 1985. Can. J. Microbiol., 31: 1061-1064 et Can. J. Microbiol., 31: 467-471.

ONISHI, H., 1960. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 24 (2): 131-140.

ONISHI, H., 1961. Agric. Biol. Chem., 25: 341-349.

ONISHI, H., 1961. U.S. Patent no. 2,986,495.

ONISHI, H., 1963. Agric. Biol. Chem., 27 (7): 543-547.

ONISHI, H., 1963. Adv. Food. Res., 12: 53-94.

ONISHI, H., 1971. U.S. Patent no. 3,622,456.

ONISHI, H., N. Saito, et I. Koshiyama, 1961. Agric. Biol. Chem., 25 (2): 124-130.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

ONISHI, H., et N. Saito, 1961. Agric. Biol. Chem., 25 (10): 768-772.

ONISHI, H., et T. Saito, 1962. Agric. Biol. Chem., 26 (12): 804-808.

ONISHI, H., et T. Suzuki, 1970. Biot. Bioeng., 12: 913-920.

ONISHI, H., et Y. Shiromaru, 1984. FEMS Microbiol. Letters, 25: 175-178.

PAREKH, S.R., et N.K. Pandey, 1985. Biot. Bioeng., 27: 1089-1091.

PETERSON, W.H., W.F. Hendershot et G.J. Hajny, 1958. Appl. Microbiol., 6: 349-357.

PRESCOTT, S.M. et C.G. Dunn, 1959. Industrial Microbiology, 3e édition, McGraw-Hill Book Co. Inc., chapitre 9, pages 208-217.

RAMACHANDRAN, N., et G. Sulebele, 1979. Indian J. Microbiol., 19 (3): 136-141.

SPENCER, J.F.T. 1968. Progress in Industrial Microbiology, 7: 1-42.

TOKUOKA, K., T. Ishitani, S. Goto, et K. Komagata, 1985. J. Gen. Appl. Microbiol., 31: 411-427.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

TREVELYAN, W.E., 1962. British Patent no. 884,822.

TROOSTENBERGH (de), J.C., et B.L.H.M. Avalosse, 1984-85. Brevet européen no. 0,136,802.

TROOSTENBERGH (de), J.C., B.L.N.M. Avalosse, et R.L. Mignolet, 1984-85. Brevet européen no. 0,136,803.

TROOSTENBERGH (de), J.C., L. Reuliaux et F. Oudenne, 1984-85. Brevet européen no. 0,136,804.

TROOSTENBERGH (de), J.C., B.L.H.M. Avalosse, et R.L. Mignolet, 1984-85. Brevet européen no. 0,136,805.

VIJAIKISHORE, P. et N.G. Karanth, 1984-85. Third European Congress on Biotechnology (Proceedings), volume 11, pages 95-100, Munich, septembre 1984.

VIJAIKISHORE, P. et N.G. Karanth, 1984. Appl. Biochem. Biot., 9: 243-253.

VIJAIKISHORE, P. et N.G. Karanth, 1986. Biot. Letters, 8 (4): 257-260.

VIJAIKISHORE, P., et N.G. Karanth, 1986. Appl. Biochem. Biot., 13: 189-205.

VIJAIKISHORE, P. et N.G. Karanth, 1986. Process Biochem., avril 1986, pages 54-57.

VIJAIKISHORE, P. et N.G. Karanth, 1986. Process Biochem., octobre 1986, pages 160-162.

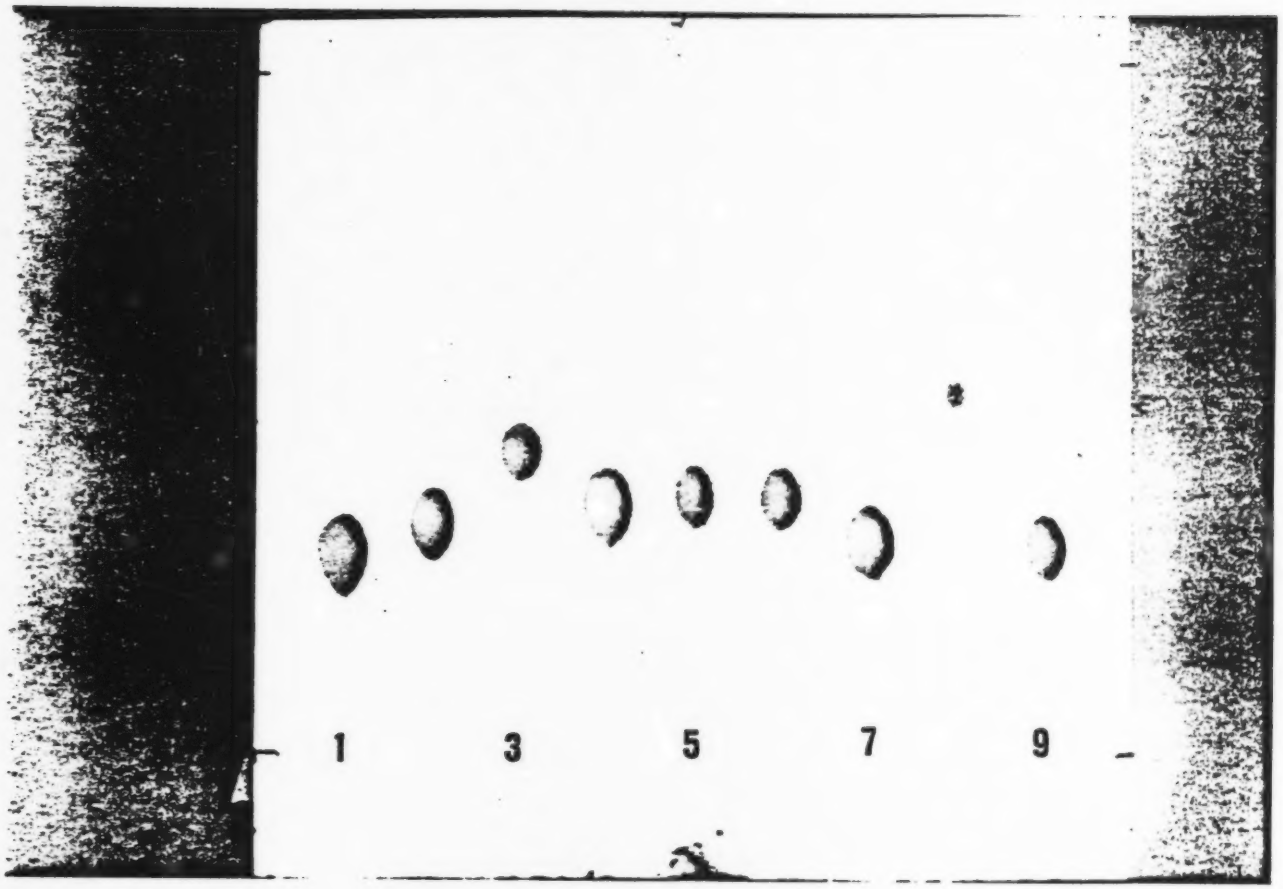
WATANABE, K., Yamada, T. Sazanami, et E. Asahara, 1986. Enzyme Microb. Technol., 8: 318.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

ANNEXE "A"

Exemples d'analyse de sucres et de polyols par chromatographie sur couche mince de cellulose

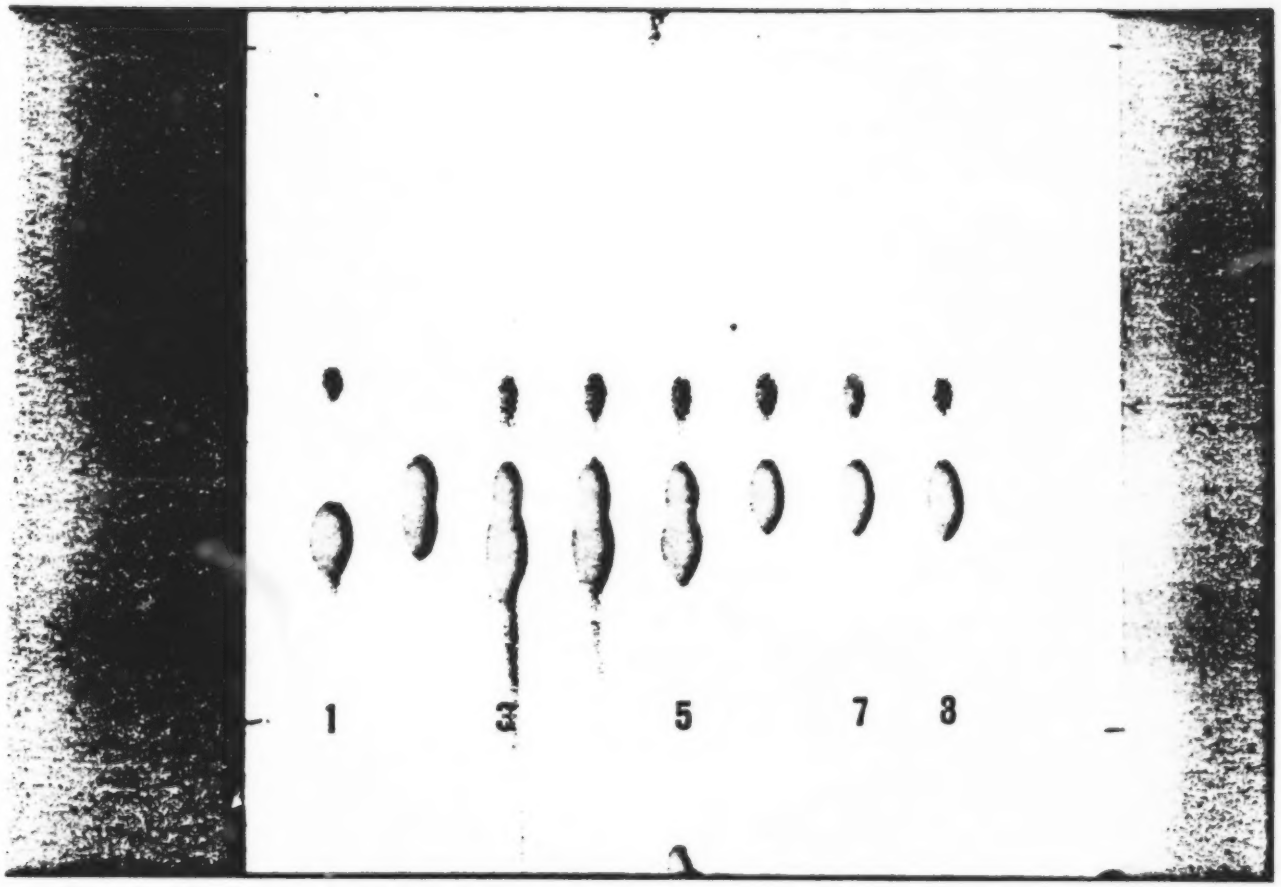
CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC



1	glucose	6	D(+)-arabitol
2	fructose	7	sorbitol
3	i-érythritol	8	glycérol
4	xylitol	9	D-mannitol
5	L(-)-arabitol		

FIGURE 17: Exemple d'un résultat d'analyse qualitative de certains sucres et polyols par chromatographie sur couche mince de cellulose.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC



1	glucose + glycérol	5	82 h
2	D-mannitol + D(+)arabitol	6	96 h
3	60 h	7	101,5 h
4	71 h	8	120 h

FIGURE 18: Suivi d'une fermentation (Figure 13) par chromatographie sur couche mince de cellulose.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC